

生命科学实验指南系列



Culture of Human Stem Cells

人干细胞培养

〔英〕R.I. 弗雷谢尼 〔英〕G.N. 斯泰赛
〔美〕J.M. 奥尔贝奇 著

章静波 陈实平 等 译

科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

Culture of Human Stem Cells

人干细胞培养

〔英〕R. I. 弗雷谢尼
〔英〕G. N. 斯泰赛　　著
〔美〕J. M. 奥尔贝奇

章静波　陈实平 等　译

科学出版社
北京

图字：01-2008-2169 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科 学 出 版 社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717
http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

参译人员

（以章节排序）

章静波（中国医学科学院基础医学研究所）
王艳辉（中国医学科学院基础医学研究所）
陈实平（中国医学科学院基础医学研究所）
董　敏（中国医学科学院基础医学研究所）
孙　冰（中国医学科学院基础医学研究所）
邓婷婷（中国医学科学院基础医学研究所）
韩　钦（中国医学科学院基础医学研究所）
杨　卓（中国医学科学院基础医学研究所）
卢　姗（中国医学科学院基础医学研究所）
王世华（中国医学科学院基础医学研究所）
李志琴（中国医学科学院基础医学研究所）
狄凯军（中国医学科学院基础医学研究所）

审　　校

章静波　陈实平　韩　钦

译者的话

自从1988年首次报道人胚胎干细胞系建立以来，有关干细胞的文章源源不断地涌现于相关的杂志，我国也不落后。只要翻翻各种生物学或医学杂志，均可在每期中找出1～2篇，甚至好几篇，这是好事。这表明我国科学工作人员窥察到干细胞研究的重要意义——无论在理论上或是已有的治疗价值（如输血）和潜在的治疗价值（如各种可以细胞替代治疗的疾病）。事实上，我国在干细胞研究与应用中已创造出不少成绩，例如，大型脐带血血库的建成挽救了不少患者的生命，以及以干细胞为基础的组织工程研究与应用等。

然而，正如某些事情的“初级阶段”那样，总会出现一些“不标准”、“不规范”，甚至误导与错误的结论。譬如，间充质干细胞的来源、定义、特性、分化方向与途径、应用等等均是“众说纷纭”。不仅在我国，在世界范围内也是如此。为此意图给出一个标准的、规范的干细胞培养方法，以便使干细胞研究一开始便沿着正确的轨道发展。以世界著名的细胞培养专家R. Ian Freshney等著的《人干细胞培养》应运问世，不能不认为是干细胞研究的及时雨。

本书介绍了10余种干细胞的培养方法，包括胚胎的、新生儿的以及成体的干细胞。因此，具有代表性和全面性。每一章的开头有一个十分简明的背景介绍而所列出的方案步骤翔实，甚至试剂的配制也一一告之，由此突出了本书的实用性。此外，每一个方案后还附有试剂和供应商名录，尽量给使用者以方便，体现出以人为本的撰写格式。

相信本书的出版有利于推动我国干细胞研究的规范化，并相信我国科学工作者的研究成果更加会受到国际同行的肯定与赞赏。

本书于2007年由世界著名出版社John Wiley & Sons出版公司出版，这一点也反映出它的时效性与权威性。我们认为应以较快的速度，较准确地将它翻译出来，供国内同行参考。为此我们邀请了中国医学科学院基础医学研究所主要从事干细胞研究的专家翻译，他（她）们不仅具备丰富的干细胞理论知识，同时也都是“最有实践经验的战士”*。我们承担这项工作感到有一定的责任与压力，因为不能有“误译”并导致“误导”，然而面对压力我们感到仍然要勇于承担，因为我们觉得我国的干细胞研究必须要起步准确，翻译此书即可借他山之石促进我国干细胞研究更扎实、更快速地发展。因此也就义不容辞地“当仁不让”起来了。

章静波

2008年12月于北京

---

* 毛泽东说：“世界上最聪明、最能干的是最有实践经验的战士。”

前　言

在过去的几年中，由于对人干细胞的研究兴趣激增，开辟了一个探索从最早期的细胞到功能充分分化的细胞（诸如神经元、心肌细胞以及如骨和软骨这种坚硬组织的细胞）的分化调控领域。这不仅为研究调控机制提供了模型，而且也为组织修复所需的工程生产合适的移植物创造了有意义的机会。胚胎干细胞、从脐带和牙胚（tooth germ）获得的干细胞、从骨髓和其他部位获得的成体干细胞均为异体移植物或自体移植物提供了潜在的源泉。有关干细胞的特性、干细胞识别标志的探讨，以及伴随正常干细胞和胚胎癌分化表型表达的标志表达调控改变已有不少论述。本书的目的在于直接介绍干细胞培养的方法学和其特性。虽然其中的不少技术仍处于发展阶段，但现仍有众多的已建立的技术需要介绍给涌入干细胞研究领域的研究者们。

本书遵循以前 *Culture of Specialized Cells* 系列丛书的传统方式撰写，在来自胚胎的、新生的、成体的组织中的众多干细胞中，只描述有限的代表性技术，其重点在于实践指导。研究者只要有一定的基础，在没有原始文献来源或其他出版物的情况下，仍应有可能按本书方案进行实验。因此本书提供的是一种适合的入门性指导，它使得进入该领域的新手们，其中包括基础科学的和有临床背景的研究人员，熟悉当前被人们所应用的某些技术方法，以及增进他们在该领域的知识，或者有助于发展他们自己的研究项目。

本书从 Glyn Stacey 和 Jonathan Auerbach 撰写的第 1 章有关基本质量控制议题开始，接着介绍由 Jessica Cooke 和 Stephen Minger 撰写的由早期胚胎建立的人胚胎干（hES）细胞系，由 Jamie Jackson，Peter Tonge 和 Peter Andrews 撰写的人胚胎干细胞系（和胚癌）分化成神经细胞，由 Christine Mummery 撰写的心肌细胞分化，由 Lee Turnpenny 和 Neil Hanley 撰写的原始生殖细胞的原代培养及其特性，以及 Stefan Przyborski 撰写的胚癌干细胞的培养及其特性。这六章涵盖了这些细胞系的特性、分化以及它们的冰冻保存。从新生儿中已发现了一个新的、令人兴奋的干细胞来源，因此有两章举例来阐述，一章是由 Young-Jin Kim 所介绍的脐带，另一章是由 Wataru Sonoyama，Takayoshi Yamaza，Stan Gronthos 和 Songtao Shi 所介绍的牙胚。最后五章介绍的是成体间充质干细胞，其来源有 Carl Gregory 和 Darwin Prockop 介绍的骨髓基质；Charles Archer，Sarah Oldfield，Samantha Redman，Laura Haughton，Gary Dowthwaite，Ilyas Khan 和 Jim Ralphs 介绍软骨；由 Yiqin Du 和 James L，Funderburgh 介绍角膜；由 Mark Labarge，Ole Petersen 和 Mina Bissell 介绍乳腺干细胞，以及由 Kristine Safford 和 Henry Rice 介绍来自脂肪组织的干细胞。

有些技术会不止一次被提及，例如在第 2 章和第 4 章中都谈到小鼠胚胎饲养细胞。由于所提供的技术略有不同，因此它们的内容均予以保留。在第 2 章中还讨论了其他饲养细胞系统，在第 5 章提供另外一种饲养细胞的方案（STO 细胞），而在第 7 章中则提供了脐带血间充质干细胞（CB-MSCs）。冻存细胞的方案在第 2、6、8 和 9 章中也都提到。它们之中大多均谈到对绝大多数培养细胞目前标准冻存程序的变更，即以 1℃/min

的缓慢冷却，在液氮中贮存，快速解冻使细胞复元。然而，人们发现 hES 细胞在快速冻融过程之后存活得较好，因此有关此内容在第 2 章中叙述。

本书的每章均以标准化格式撰写，并力图使用统一的术语和缩略语。例如，缩略语 PBSA，表示无 Ca^{2+} 、Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水，而 UPW 是指不限用什么方法制备的组织培养级的超纯水。设备和材料的来源一并列于每章之末，而不写在正文内，在本书之后则附有供应商网址及其综合产品名录。诸如胰蛋白酶消化和细胞计数等基本程序，除非与常规步骤有所不同，则常不予详尽地描述。此外，我们认为，某些先决条件会在仪器和设备配套时业已提供，因此诸如层流超净台或是生物安全橱、台式离心机、水浴锅、吸管、70%乙醇等均未在每一个方案中列出。有关基本设备、仪器和技术的介绍可阅读 Freshney（2005）所著，John Wiley & Sons 出版公司出版的 *Culture of Animal Cells；a manual of basic technique** 。我们认为本书读者在从事这些更为复杂一些的方案之前是业已具备相关基本操作知识的。

我们十分感激各位撰稿人不惜用大量宝贵的时间准备与撰写详尽的章节。我们认为所选题材具有良好的代表性，我们并不意图使它变为百科全书式的或是十分全面的书籍，这样必然部头十分宏大，成本也会增加。我们希望本书风格、版式以及内容对那些从不同学科进入该领域的人们以及那些已具有某些基本经验的人们均有一定的价值。读者或许也希望了解由 Stephen Sullivan 主编的《人胚胎干细胞：实用手册》，它将由 John Wiley & Sons 出版公司，2007 年推出。

R. IAN FRESHNEY
GLYN N. STACEY
JONATHAN M. AUERBACH
（章静波 译）

*《动物细胞培养——基本技术指南》. 2008. 科学出版社.

目　录

第1章　干细胞系的质量控制程序

GLYN N. STACEY[1] and JONATHAN M. AUERBACH[2]

[1] Division of Cell Biology and Imaging and the UK Stem Cell Bank，National Institute for Biological Standards and Control，South Mimms，Herts.，EN6 3QG，UK

gstacey@nibsc.ac.uk；[2] GlobalStem，Inc.，Rockville，MD 20850，USA，

JAuerbach@GlobalStem.com

1.1　导言

人类细胞的体外培养为深入研究细胞生物学、疾病过程和可能的治疗方法提供了重要手段。人胚胎干细胞培养的问世开创了令人兴奋不已的多种新的可能性，其中包括可将它们应用于人类再生医学（regenerative medicine）。然而，体外细胞培养也带来了诸多的挑战：细胞和细胞培养的环境是许多微生物生长的良好条件，细胞本身也易于发生遗传学改变。此外，不幸的是，在实验室操作过程，常发生细胞培养物的交换，交叉污染（cross-contamination）或是忘记标记。所有这些挑战使得我们必须规定出细胞培养的三个关键性的基本特征，这样方可保障高质量的培养，这些特征是：

- 纯度——细胞没有受到微生物的污染
- 特性——名副其实的该种细胞
- 稳定性——在体外生长和传代过程中，其基因型和表型仍然稳定

连续传代会使得细胞培养有反复暴露于被环境微生物污染的危险。这类污染通常可因培养基pH的明显改变（可由培养液的颜色改变来判定），或是突然混浊起来，或是有霉菌集落浮现而被识别。在这些情况中，培养物通常是不可挽救的而要谨慎地处置以免污染其他培养物。然而，某些微生物污染能建立起潜在的永久性感染，此时在光学检

查下它们不是很明显。它们通常是支原体污染，也可能是其他有机体所导致［Mowles et al.，1989；Buerhing et al.，1995］。

现已知支原体污染对于细胞有诸多永久性的和有害的作用，其中包括引起染色体异常［McGarrity et al.，1984］和细胞转化［Zhang et al.，2004，2006；参见 Rottem and Naot 综述，1998］。普通光学观察不能观察到支原体污染。此外，同一个人或是他人操作均可能引起快速传播，并且也很难可靠地消灭。因此，重要的是要对细胞培养的支原体污染进行常规筛查。

Gey 等于 1952 年所建立的第一个人 HeLa 细胞系［Gey et al.，1952］业已广泛地遍布各实验室，而各实验室也想建立新的细胞系。仅仅在很短的几年里，已有多个“新的”细胞系被建立起来了，但事实上这些细胞系是 HeLa 细胞的交叉污染所产生的［Gartler et al.，1967］。通过胞核学和同工酶分析该问题便十分清楚了［Nelson-Rees et al.，1981；O'Brien et al.，1977］，但这也仅仅得到部分解决，而且造成诸多的科学争议［Gold，1983］。自从交叉污染培养早期事例的识别，类似事例继续不断地被认识（表 1.1）。尽管有责任心的细胞培养专家［Stacey et al.，2000］常常提醒该问题的部分原因可能起源于实验室中最初细胞系的交叉污染［MacLeod et al.，1999；Drexler et al.，2003］。重要的是这种情况尚未在干细胞系中出现，不然会引起实验的混乱以及潜在临床应用问题，并且还会阻碍干细胞技术的进一步发展以及被人所认可。

表 1.1 文献揭示那些与原申请不符的细胞系

参考文献	细胞系
Gartler [1967]	乳腺癌细胞系交叉污染
Nelson Rees et al. [1977]	人乳腺瘤细胞系和其他细胞系的广泛交叉污染
Harris et al. [1991]	推定人何杰金病细胞系与非人类细胞交叉污染
Masters et al. [1988]	膀胱癌细胞系的交叉污染
van Helden et al. [1988]	食管鳞状上皮癌细胞系之间的交叉污染
Chen et al. [1990]	TE671 来自 RD 细胞
Drexler et al. [1993]	一株白血病细胞系的交叉污染
Reid et al. [1995]	U937 细胞的交叉污染
MacLeod et al. [1997]	Dami 巨核细胞原是 HEL 红白血病细胞
Dirks et al. [1999]	ECV304 内皮细胞原是 T24 膀胱癌细胞
MacLeod et al. [1999]	由建系者送交 DSMZ 的白血病细胞系中 18%有交叉污染

建立 hES 细胞系的一个关键问题在于不同中心在不同条件下所分离到的 hES 细胞的稳定性与可比性。迄今已有许多文献谈到了新的培养方法和分化方法，然而，每篇文章通常只涉及非常有限的细胞系。导致 hES 细胞研究者不禁要问，作者们所提供的资料是否可更广泛地适用于所有的 hES 细胞系。因此人们已在考虑技术标准化的问题［Loring and Rao，2006］，此外，在国际化基础上定出 hES 细胞的特征也在考虑之中［Andrews et al.，2005］。概括说来，标准化的设想都是以用于研究胚胎癌早期发生模型所建立的抗体标志为基础的［Andrews et al.，2002］。迄今有关干细胞的分子和抗体

标志已越来越多，这将可应用于对干细胞系的质量控制［Andrews et al.，2005；Loring and Rao，2006；以及参阅以下几章］。在下面的几节里，我们将探讨用于测试干细胞系的纯度、鉴定、稳定性的各种技术和方法，规范它们在干细胞研究中的应用。虽然这些技术方法都是针对 hES 细胞系的，但它们也同样适用于所有的其他细胞系，不论它们是否来自干细胞，也不论它们是胚胎的、新生的或是成体的干细胞。

1.2　细胞入库原则

为了减少污染和遗传改变的机会，细胞的传代次数愈少愈好。因此重要的一个举措是采用在工业中被应用多年的称为主库/运转库的原则。就是要建立一个主细胞库（master cell bank），它为某一细胞系的今后运作提供参照系。该细胞库的性质特点应十分明确，并且要通过质量控制测试。然后将从主库分装的细胞用来产生更大的运转细胞库（working cell bank）。该库的细胞可用于实验，或者向其他工作者再分发［Hay et al.，2000］。对运转细胞库还应再次进行质量监控，虽然此时的监控面较窄，主要集中于特性和没有受到污染。如果这种层叠式的主控/运转细胞库系统（图 1.1）能正确地履行，那么它将能够在数十年内为研究工作提供特性一致的培养物，而且还可以重复生产以及可靠地供应。

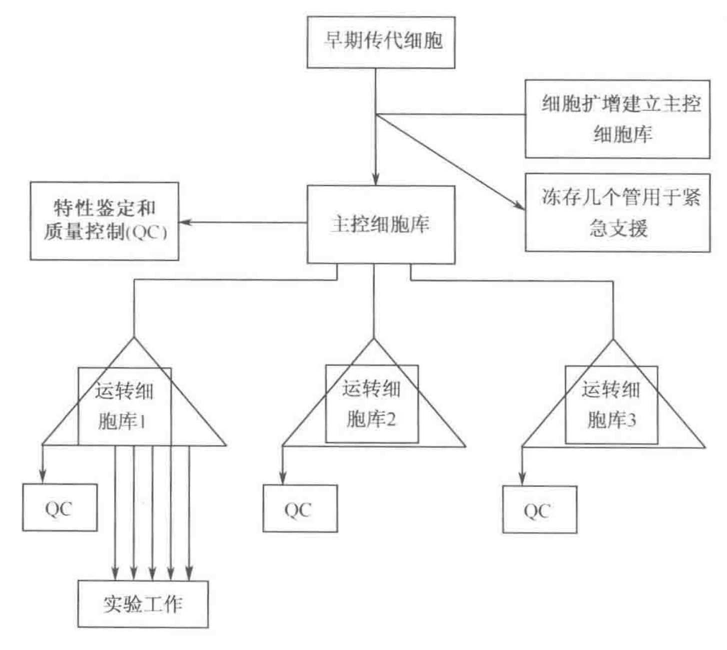


图 1.1　建立主控和运转细胞库的示意图

质量监控测试对所有细胞库应当成为一件常规的事情。其中包括活力测试（用经典的台盼蓝拒染试验）以及检查有无细菌、真菌、支原体污染［Stacey and Stacey，2000］。至少每隔 5 天即应对培养物进行这些检测，最好受测的培养物在 2 次传代时不用抗生素，这样可以确保污染物不因抗生素的抑制而检测不出来。可靠性的其他检测（例如细胞核学、DNA 指纹图、同工酶分析、表面标志）以及是否存在病毒的试验也可

以进行，但是检测项目的范围要取决于受试的细胞类型和细胞的用途。有关细胞库和质量控制的一般参考文献可参阅 Stacey 和 Doyle 的论文 [2000]。下面几节我们将讨论特殊的举措和方法。有效的冰冻保存方案对细胞存库显然是至关重要的（见第 2，6，8，9 章）。其他细胞系以及小鼠胚胎干细胞系保存的标准方法比起玻璃化方法（vitrification method）用于 hES 细胞并不那样成功有效 [Reubinoff et al.，2001；Zhou et al.，2004；参阅第 2 章]。用于 hES 细胞的大多数玻璃化方法都是从适用于牛卵细胞和胚胎细胞的方法改良过来的。最常被参考的用于 hES 细胞的改良方法源于 Reubinoff 等 [2001] 的文献。所报道的成功方法通常均利用二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide）和乙二醇（ethylene glycol），但是各家报道的细节有所不同。Hunt 和 Timmons [2007] 有一篇综述讨论了当前所用的各种方法学。对于 hES 细胞的保存，玻璃化有许多短处，其中包括需要谨慎地维持在与液氮温度相近的贮存温度以避免去玻璃化（devitrification），在如此的贮存条件下所需的运输费用较高，每一冻存管的存库细胞数量很小，以及为了达到玻璃化的成功需要快速的冷却率（cooling rate）。

1.3 细胞特性

1.3.1 活性

细胞活性显然是十分重要的，但是这一特性在细胞培养中常常未予应有的注意。现在有许多方法可确定细胞的活力。每一方法可测定细胞生物学的不同特征（例如，膜完整性、膜的功能、细胞损伤或死亡所释放的产物、代谢功能、酶活性以及克隆形成的存活等），表 1.2 列出了测定“活力”的技术实例。要记住的是这些测试所揭示的细胞特征可以受到特殊培养条件的不同影响。

表 1.2 动物细胞培养的活力检测

方法	原理和评点
染色拒斥（例如台盼蓝、萘黑）	进入细胞的染料被活细胞胞膜作用而排斥，因此不含有染料的细胞的细胞膜功能正常，可能是活细胞 优点：快速，通常易于进行 缺点：由于凋亡细胞仍具有活性的胞膜，因此会过高估计细胞的活力
中性红试验	活细胞将红颜料累积于溶酶体中，可用分光光度计进行分析，测定染料的掺入
3-(4,5-二甲基噻唑-2-yl)-2,5-二苯基四唑氮盐(MTT)试验	MTT 还原反应形成可进行测定的有颜色的产物，也表明有生物化学活性 优点：许多测试可以用 96 孔板快速地在自动阅读仪上测定 缺点：某些受抑制的细胞也显示有低 MTT 还原值，该值不一定与细胞活力有关。
荧光素双乙酸盐试验	荧光素双乙酸盐进入细胞并被细胞内酯酶降解，所释放出来的荧光素不能逸出完整的细胞膜，因此在 UV 光下观察可见细胞发出荧光。 优点：程序快速 缺点：需要有 UV 显微镜或是流式细胞仪

虽然基于检测凋亡细胞的活力测定方法也常使用［例如可参阅 Sparrow and Tippet，2005］，但台盼蓝拒染试验［Patterson，1979］是最常用的方法之一。无论用什么方法，重要的是它要与细胞培养应用有关，并且应能提供可重复的结果。对于干细胞培养来说，要明确的是，活力测定并不能预示经培养处理或是冰冻保存之后的培养物中干细胞的比例，但是细胞冻存的干株的活力仍能够并应当通过将冻存管中的细胞立即在培养液中复苏而及时地测定。

1.3.2 细胞核学

细胞染色体的观察（核型分析）为基因组的物理结构研究提供了一个有价值的方法。它曾被用作监测细胞培养遗传稳定性的有价值的工具［例如，可参阅 Rutzky et al.，1980］，另外也可用于判断是否出现转化的细胞（transformed cell），它们常常是非整倍体（有染色体丢失或重复，或是有诸如易位、缺失、倒位等异常染色体），或是异倍体（每个细胞的染色体数范围很广，常常比正常数目多）。

目前最常用的观察染色体的方法是应用秋水仙碱（colchicine）或是类似化合物将细胞分裂阻滞在中期。此时，每个染色体分开以及浓缩，因此十分便于观察（参阅第5章）。然后将细胞收获，以低渗盐水 KCl 或是柠檬酸盐水使其膨胀，用乙酸甲醇（acetic methanol）固定，并滴在显微镜载片上，以使产生特征性的染色体“展示”（spread）。然后用 Giemsa 染色以观察这种浓缩的染色体。成对染色体的识别以及分辨染色体结构微细改变的性质的能力是在 Giemsa 染色之前用胰蛋白酶消化来实现的，它可以显示每个染色体特征型的分带图型［Wang and Federoff，1972］。迄今也已建立了一些其他的染色体研究技术，诸如 Q 和 R 显带及染色体涂染（chromosome painting）。但所介绍的 Giemsa 显带是最为广泛采用的方法，而且通常也用于鉴定各种干细胞培养系统。方案16.5给出了经典的方法并且综述了其他方法［Freshney，2005］。

最近，hES 细胞培养的研究显示它们有发生胞核学改变的倾向，因此要维持干细胞是未分化状态以及保持其二倍体核型成为一个主要的挑战。迄今还没有一个培养系统能够完全防止 hESC 细胞系有累积核型异常的倾向性。人们感到由于 hESC 细胞系的培养系统并不理想，存在着选择压力，却因此有利于染色体复制并可能获得适应性机会［Draper et al.，2004；Andrews et al.，2005］。对于 hES 细胞来说，染色体改变似乎有一种常发生的形式，它代表着这些细胞对体外培养条件的“适应性”（adaptation），最显著的改变涉及12号和17号染色体［Draper et al.，2004］。图1.2例示了正常 hES 细胞系的核型。

重要的是，需证实冻存的细胞保留有二倍体核型，并且要定期检查所用的细胞以确保你发表文章时所用的数据皆由二倍体细胞所得，除非你旨在研究转化的培养细胞，则另当别论。许多细胞遗传学实验室以及某些承包测试公司可以提供核型分析测试服务，为临床服务的常规诊断细胞遗传测试常分析10～20张中期相展片，虽然这种检查可以确定培养中占主要地位的转化克隆的形态表现，但也可能检测不出发生于早期培养不稳定阶段的低水平的转化子（transformant，即转化细胞），因此为了检测（或摒除）低镶嵌性，至少要计数50张中期染色体展片。

目前人们正在继续努力去发展以芯片为基础，或是分子的检测方法进行 hES 培养

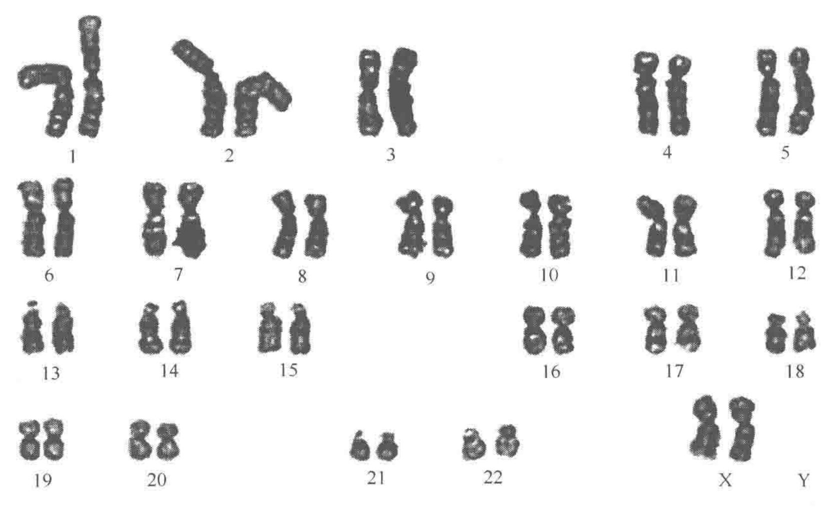


图 1.2　二倍体人 ES 细胞核型

细胞核型稳定性分析。其中之一的方法便是基于单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）基因分型。SNP 阵列对于确定遗传性疾病的标志以及揭示肿瘤中杂合性丢失（LOH）都十分有用。当前技术的进展已使我们能利用寡核苷酸 SNP 阵列高分辨地测定染色体拷贝数［Zhao et al.，2004；Nannya et al.，2005］。这样便扩展了 SNP 的应用以检测非相互易位（nonreciprocal translocation）、非整倍性，以及染色体上的部分扩增或是缺失，甚至小的染色体区的扩增或是缺失［Maitra et al.，2005］。比起常规方法来 SNP 阵列方法有某些方面的优点，其基础即在于可检测基因组改变的分辨率和大小。由于最小检测信号为 10SNP 序列，因此当前 550 000 SNP 的阵列有效分辨率大约为 28kb，而 660 000 SNP 的阵列有效分辨率为 25kb。因此，随着密度阵列的增加，该技术还可得到进一步的发展。但要记住的是，该技术有一个局限性，即目前仍缺乏分析异质的或是嵌合的细胞群体的分子学方法。

1.3.3　鉴定测试

1.3.3.1　起源种属的确认

同工酶分析的原理是基于测定不同同工酶活性的荷质比（charge-to-mass ratio）并利用琼脂糖凝胶分离各种多态酶（polymorphic enzyme），它们则可具备相同的某一种的酶活性。细胞溶解后，所释放的酶可以稳定于缓冲液中，然后将所制得的样品进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶以特异的酶底物处理，反应的观察通过有紫色的甲臜（formazan）产物形成而得知，自有了商业化试剂盒（AuthentiKit，Innovative Chemistry）之后，该方法更加可靠，只需一个工作日便可完成特殊酶的测试。通常所用的酶在于它们能够在物种间识别多态性，同时仍保持物种间的单态性。单个酶测试可能不足以识别此来源的物种，但用两种或三种酶底物则可明确识别来源的物种［Stacey et al.，1997；O'Brien et al.，1967；Doyle and Stacey，2000］，而且也可识别胚胎的亚型（isoform）。图 1.3 为同工酶（isoenzyme）分析的一个实例。

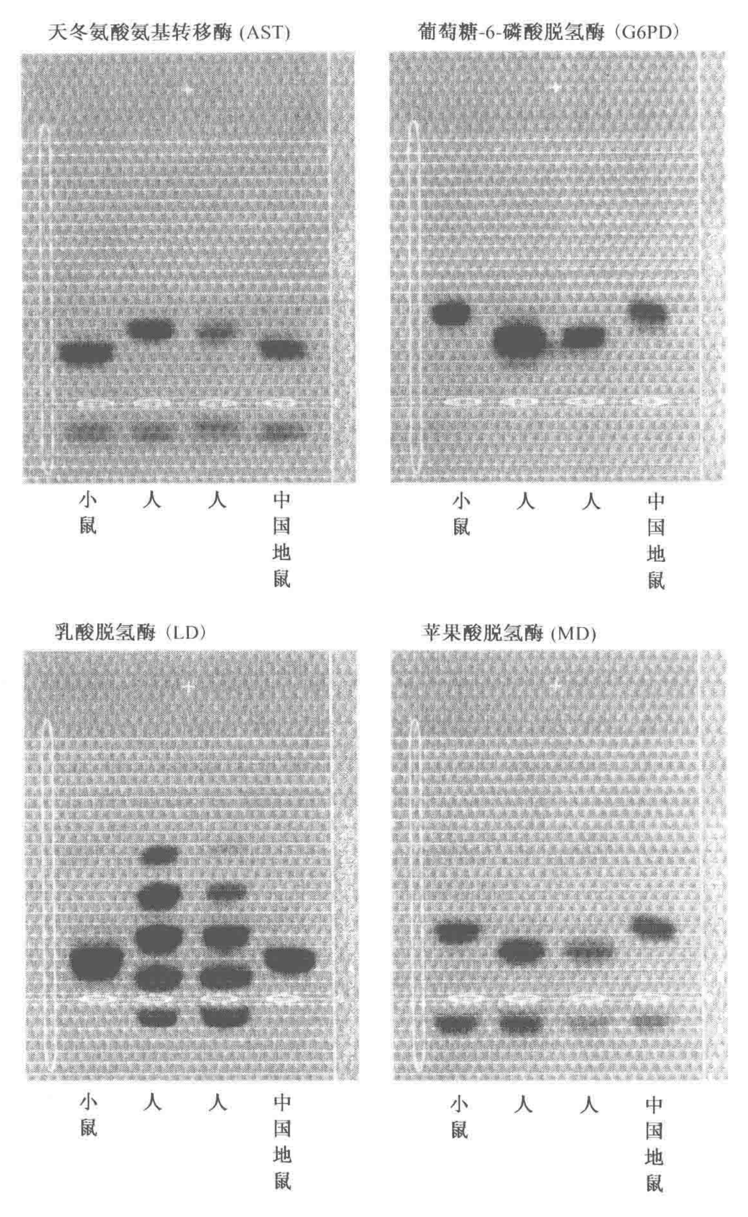


图 1.3　小鼠、人和中国地鼠细胞系细胞的同工酶图（ATCC 馈赠，Freshney 改良［2005］）

这种分型能够在一个工作日之内很快地鉴定出物种的来源。此外，依据所用酶的底物，还可以鉴定小鼠细胞系的来源株。这种水平的鉴别对于一个用多种物种细胞的实验室是很有价值的，但对只做人细胞系培养的实验室可能不怎么有用。

现已有许多基于保守序列聚合酶链反应（PCR）进行扩增［例如 Stacey et al.，1997］和诸如细胞色素氧化酶这样的特异基因的序列测定的分子方法用来确证来源的物种［Folmer et al.，1994；Herbert et al.，2003］。后一种方法可对每一物种特异性的序列进行测定，其技术支撑是美国国家生物信息中心（www. ncbi. nih. gov）的序列数据库不断增大，因此可成为对物种鉴定的很好的参考。

物种识别是细胞鉴定的有用组成部分，用哪一种方法取决于实验室中所用细胞类型，实验室工作人员有无时间进行独立的测试，以及有否适当的条件设备。

1.3.3.2 用于细胞特异性识别的 DNA 图谱

人基因组中有可变数目的串联重复子（VNTRs）以及短串联重复子（STRs）。它们是颇有意义的序列。它们由序列的重复核心单位（repeated core unit）所组成。若用某种限制酶将它们从人基因组剪切的话，其中某些便可显示出个体间特定的基因座重复子单位的多态性。1985 年 Alec Jeffreys 发现经电泳后以某种基因组探针和 Southern 印迹分析则这种变异可以用来识别和区分各个个体［Jeffreys et al.，1985］。基于其他的 VNTR 序列，也有研究者找到了相似的探针［Vassart et al.，1987］。

20 世纪 90 年代，基于不同探针对细胞系 DNA 的 Southen 印迹杂交技术得到迅速发展［Gilbert et al.，1990；Hampe et al.，1992；Stacey et al.，1992］，而且包括以 PCR 为基础的 DNA 图形在内的这些有效方法，很快地揭示了许多交叉污染的事例［例如，MacLeod et al.，1999；van Helden et al.，1988］。

STR 位点由长度为 3～7 个碱基对的短重复序列组成。这些重复序列遍布于人基因组中成为高度的多态标志的丰富源泉，并可常规地用 PCR 检测。STR 基因座的等位基因由于扩增区中有许多重复序列拷贝而有所不同，因此，可用放射性、银染或是电泳分离后的荧光检测相互区别开来。现已有商品试剂盒，它们包含有标记的引物，可检测 8 或 16 基因座上重复序列的数目。这些基因座可以满足全球数个主要标准化实体的需要，例如美国 FBI 已从 16 组中筛选出 13 个 STR 核心基因座以搜索或包含 CODIS（Combined DNA Index System）的标本和 US 国家罪犯 DNA 图形数据库的样品。8 基因座系统的配对几率在高加索美国人中为 $1/1.15\times10^{8}$，在非洲裔美国人中为 $1/2.77\times10^{8}$；若是 16 基因座系统则前者为 $1/1.83\times10^{17}$，后者为 $1/1.41\times10^{18}$。图 1.4 显示 STR 的电泳图。

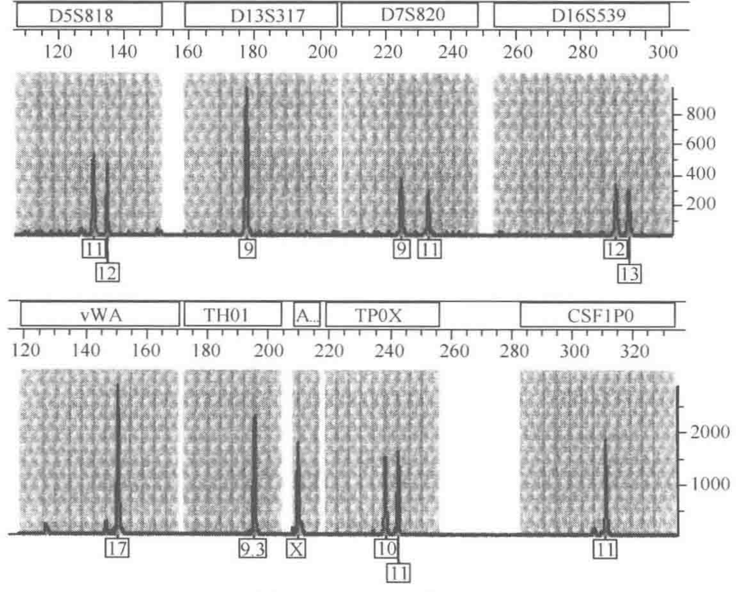


图 1.4　STR 电泳图

1.3.3.3　抗体标记

抗原表达图形是任何细胞的一个重要特征。人们常常用一组抗体来确定 hES 细胞的抗原，并显示培养细胞的典型反应模式（表 1.3）。用免疫组织化学结合流式细胞仪定量分析可极好地对 hES 细胞的特性进行免疫分型。数种常用的标志主要是以单个前体（乳糖神经酰胺）为基础的，它要经过包括糖基化在内的生化修饰，以产生代表阶段特异性早期抗原（SSEAs）的不同表位 [Gooi et al., 1981; Kannagi et al., 1982, 1983]。现已证明，其中的某些标志对于跟踪 hES 细胞分化颇为有用 [Draper et al., 2002]，虽然它们不是这种细胞类型所特有的，但仍然是 hES 细胞的关键性识别标志。我们还需要有与干细胞生物学功能直接相关的新标志。

当寻找干细胞系特征性的抗体时，谨慎行事时很重要的，所采用的每一个抗体要按供应商所标明的那样，注意其准确的类型、特异性以及其滴度。基本的操作方法在他处已有描述 [Hybridoma Bank, USA, www.uiowa.edu/~dshbwww/]，但是新进的抗体绝对要与已接受应用的货源进行平行比较，而且在实验工作中还必须包括抗体同型对照（antibody isotype control）。还有一点很重要，即对于那些可能涉及干细胞系错综复杂特性的抗体要进行区分。表 1.3 定出数种可能被用到的抗体标志。在对主库种细胞进行特异鉴定或是在发表文章时，要全面介绍它们的抗原特异性。在英国干细胞库（UK Stem Cell Bank）中包括有如表 1.3 所列的那些系列的标志，既可用于主库又可用于分库的种细胞鉴定（见图 1.1），以确保分散到研究人员手中的细胞，其质量是有保障的。用于实验工作的培养物的质量控制显然是人们所要求的，但是这种情况下要进行详细的分型是不切实际的。在实验性的或贮存性培养细胞常规观察中 hES 细胞的形态观察可以显示细胞的分化状态，但是若在应用培养物的关键点上，有诸如 SSEA-1 这样的分化标志的流式细胞术的资料，则是十分有价值的。

表 1.3　hES 细胞典型的抗原标志表达 [Draper, 2002]

抗原	未分化 hES 细胞的典型反应	分化 hES 细胞的典型反应
SSEA-1	—	+
SSEA-3	+	+*
SSEA-4	+	+*
Oct-4	+	+*
碱性磷酸酶	+	+*
TRA-181	+	+*
TRA-160	+	+*

* 在分化过程中可能下调 [Cai et al., 2006; Draper et al., 2002]。

1.3.3.4　基因表达

基因表达谱的研究是极具有价值的，但是基本上也只是一种研究水平上发展。诸如此类的检测方法在常规工作中的应用尚有待证实，有许多与种系相关的基因（例如 Nanog、Oct-4）以及与分化相关的基因测试实例都应予核实。为此必须十分谨慎地避

免采用那些同时可检测假基因（pseudogene）的引物，不然会造成混淆。若遇到这种情况，除非有更好的培养方法以及获得有关干细胞性质的知识，不然不要设定一组特异的基因作为质量控制。然而，收集遴选干细胞基因的基因表达谱信息和不同的分化谱系的标志显然是十分有用的，有关当前 60 个 hES 细胞系的国际研究平行分析的基因实例可查询 http://www.stemcellforum.org.uk/。

有关比较多个 hES 细胞系转录物组（transcriptome）的新近研究已识别出大约 100 个基因，它们在未分化的 hES 细胞中有高表达［Bhattacharya et al.，2005］。一项对 17 个不同的 hES 细胞系的特性进行全基因组表达阵列分析的研究表明，几乎所有的细胞系皆显示这 100 个基因有相似的表达模式［Josephson et al.，2006］。由于总体基因表达可以指示出某一特定 hES 细胞系的分化状态，因此，以所研究的特殊分化状态的参考标准进行逐个比较是最为有用的步骤。例如，人胚胎癌细胞系和稳定的、核型异常的 hES 细胞系已被认为具有这样的标准［Plaia et al.，2006］。有关微阵列表达资料则可用通常与 hES 细胞分化状态相关的一组基因标志，借助定量实时反转录酶 PCR（RT-PCR）进行很好的确证。对于未分化状态，则其少数可接受的标志可参考表 1.3。

1.3.3.5　多能性

显然这是干细胞系特性的一个关键测定指标，但所预期的结果可依据细胞类型（hES、间充质干细胞等）而各不相同。迄今已有包括如下所列的测定这种多能性的各种途径：

- 生殖系性能（仅可用于非人类干细胞）
- 在无免疫应答能力小鼠中形成畸胎瘤（见第 6 章）
- 胚胎样小体的产生，并呈现有三个胚层的结果（见第 3、4、6 章）
- 体外分化成具有三个胚层的各种细胞类型（见第 2、6 章）

在 hES 细胞研究中，通常都赞同畸胎瘤的形成（作为指标），但迄今仍未很好地予以标准化——今后用基因表达的分子方法或许有所帮助。显然这是一个挑战性的领域，在肯定地选出可靠的 QC 方法之前，人们仍需要大力研究（见第 6 章的方案和有关畸胎瘤形成的讨论）。

简而言之，若要将未分化的 hES 细胞注射至免疫缺陷小鼠，则 SCID/Beige 是常用的株系。细胞可注入后肢肌肉内，睾丸内，或是肾包膜下，有关注射部位迄今未做过仔细地比较，所有上述新提到的三个部位均可允许多能 hESC 的分化。在所有的小鼠中都有肿瘤形成，大约 8～12 周后可以依据它们的大小切下进行分析。首先要进行的是组织学分析，最好由有经验的病理学家来完成，在分析中病理学家会意图确定它们是属于三胚层（外胚层、内胚层和中胚层）中的哪一个胚层的组织。接着可以进行免疫组化和基因表达分析，以明确畸胎瘤中含有特异的终末分化的细胞谱系。典型的畸胎瘤通常与宿主组织有明确的界线，并且呈现出有组织性的细胞团簇，可能包括有软骨，矿化的骨骼、绒毛、平滑肌、神经索、神经结（neural rosette）、肝脏样结构、导管、上皮细胞构成的囊腔，以及各种类型的上皮组织。

1.4 无菌

细菌和真菌污染常常使得我们不能用受染的培养物进行工作，因为培养物会因此变得模糊不清，这些微生物的生长完全会压倒，甚至杀死培养物的细胞。污染可由实验室环境（如水浴、冰箱、洗涤槽、纸板箱等）中各种渠道引起，最有效的防止污染措施在于良好的无菌技术和正确地使用Ⅱ级安全橱（见附录 1），以及维持细胞培养实验室的清洁和整齐 [Freshney，2005，第 6 章]。抗生素在污染的可能性很高的情况下使用，例如，在原代小鼠胚胎饲养层培养或是在环境污染情况下进行常规实验工作时，可能有助于防止细胞的丢失。然而，在培养物应是“干净”的情况下，我们不推荐常规地应用抗生素，当然也不主张用于细胞库的运作。抗生素会影响细胞的功能。常规使用特异性抗生素会刺激微生物中抗药性的发生。致使要保护关键培养物时无计可施。抗生素也可能抑制，但不能杀灭支原体的生长，因此增加了支原体测试（见 1.5 节）假阴性结果的危险性。

培养物的检测可如下进行：将培养物的上清液接种于细菌肉汤中，然后在标准的细胞培养温度（通常为 35～37℃）以及室温下温育。以观察不同最适生长温度下污染子的生长状况（图 1.5）。如果只依赖于接种肉汤混浊的外表来判断污染是很难的，因为不游动的微生物可能不会造成混浊，而细胞碎片则可以引起不透亮，因此，通常要将全部肉汤标本于培养期末接种于固体的营养琼脂培养基上，来检测其上是否有任何可培养生长的微生物。

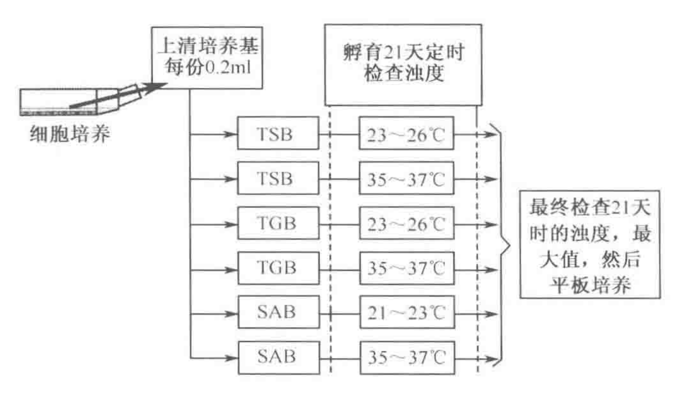


图 1.5　典型的无菌测试实例

TSB，用于分离需氧的和兼性需氧微生物的胰酶解酪蛋白大豆肉汤。TGB，用于分离厌氧的和微嗜氧的微生物的巯基乙酸盐肉汤。SAB，用于分离真菌的萨布罗肉汤。其他的培养基包括有托-休肉汤（可替代 TSB）、脑心浸液肉汤（可替代 TGB），以及 YM 肉汤（可替代 SAB）。含有血液或血清的其他培养基也可用（例如掺入 5% 去纤维蛋白的兔血营养琼脂）[Cour，2000]。

有关检测的详细参考方法发表于国家药典 [European Pharmacopoeia，2006a；US Food and Drug Administration，2005a]。

除了这些标准的培养方法外，还有许多由组织培养公司提供的试剂盒，它们可应用于干细胞工作。这些方法也与传统的培养方法一样有使用价值，因为有些比较快速，可

以检测细胞培养物中需要较复杂营养成分的微生物，而这种微生物用上述提到的标准无菌测试方法是检测不出来的。然而，若在这些测试方法中加入其他生长液，并在含 CO_2 的环境下温育，则从肉汤和琼脂培养中可分离到的微生物范围将会明显扩大［Cobo et al.，2005 及其参考文献］。迄今，最棘手的污染是各种支原体，下一节我们将讨论这些微生物的特殊检测。

1.5 支原体检测

支原体是属于柔膜体目（order *Mollicutes*）的一类微生物，它们比典型的细菌要小得多。虽然有与细菌相似之处，但另有许多特性，因此赋予了它们特殊的潜能而引起细胞培养工作的诸多问题。它们对于通常用于细胞培养的抗生素有一定程度的抵抗性，另外，它们还可通过标准的细菌学滤器。此外，它们也不一定会影响细胞的生长率，通常也不会在污染的培养物的悬浮液中产生可察觉的混浊，因此，常常被人们所疏忽。支原体的持续污染对细胞系可产生一系列永久的有害作用，因此对进入实验室的新的细胞培养物进行常规筛查，以避免播散至其他培养物是至关重要的。

检测支原体有许多技术，并且已被广泛地应用。表 1.4 列出了一些实例［可参阅 Del Guidice and Gardella，1984；Rottem and Naot，1998 的综述］。用于企业的参考方法有以 Hoechst 33258 去染以培养物悬液接种的 Vero 细胞以及用选择肉汤和琼脂培养

表 1.4 检测支原体的不同方法比较

技术	优点	缺点
肉汤和琼脂传代	高度敏感 成熟的方法 国家药典采用的标准方法	细菌可能在选择性培养基上生长 不能检测不可培养的株系 孵育期长（通常约需 50 天）
Vero 细胞培养接种和 DNA 染色	3 天出结果 国家药典采用的标准方法	必须维持与准备 Vero 测试细胞 高倍显微镜（×100 物镜） 需要 UV-荧光显微镜 细胞核碎片以及小的细菌可能结合出假阳性，尤其对于经验不足者
PCR	1 天出结果 可筛查大量样本	其敏感性尚需证实，谨慎的鉴别 巢式 PCR 可能给出假阳性结果
6-甲基嘌呤脱氧核苷（6-MPDR）	简单的终点（细胞死亡）	必须维持和准备指示细胞 需要 5 天孵育
加入主样本和指示培养物（例如 3T3，Vero）。由于支原体酰苷酶可检测支原体污染		与其他方法比较，有假阴性［例如 Uphoff et al.，1992］。
将 6-MPDR 转化为有毒代谢物，杀死指示细胞		
支原体 RNA 杂交	据报道敏感性高，但结果不全一致	检测放射性物质需要液闪计数设备 区别阴性的和弱阳性较为困难

基的培养物［European Pharmacopoeia，2006b；US Food and Drug Administration，2005b］。对于常规筛查，可用直接PCR或Hoechst 33258染色（见表1.4），但是这些方法作为常规应用通常并不如培养那样敏感。在缺乏较为敏感方法的情况下，对于那些以后需要用到的贮存培养物则应当用培养的方法。表1.5列出了一个典型的培养方法以及Hoechst 33258染色法的方案，该方案显示出双重测试可给出早期筛查结果的额外优点，而且这种结果还可在以后用更为敏感的培养方法来确证。然而，应当注意的是，培养支原体要求有相当熟练的技术。另外，还需要包括有阳性对照，而在某些缺乏适当隔离设备的实验室，这却是不能被接受的。此外，市场上还有多种不同的专利性方法，但是正如无菌试剂那样（见1.4），重要的是在充分相信它们之前，要以一个标准的、并且业已证明的方法作对照，再行应用。这样做之所以重要是因为从耗费技术时间与精力以及科学数据的无效性来说，丢失有意义培养物的长远影响可以说是灾难性的。

表1.5 支原体检测参考方法的典型方案梗概

时间（天数）	肉汤和琼脂培养	Hoechst染色
0	1. 将200μl悬浮培养基样本接种于肉汤和琼脂平板［含乙酸亚铊（thallous acetate）和猪血清］在厌氧环境中孵育	1. 将培养基置于Vero细胞单层（在盖玻片上），同时加入测试的悬浮培养液，在含5%CO_2：95%空气中孵育
第3天		2. 移出培养基，以固定液（乙酸：甲醇1：3）固定单层细胞3min。换新鲜固定液再固定3min。 3. 吸出固定液，晾干载片，浸入2ml染液（含0.1μg/ml二苯并咪胺Hoechst 33258，用不含酚红的Hank BBS或PBSA配制），室温避光孵育5min。 4. 移去染液，加入非荧光包埋剂，盖上盖片 5. 观察染色区（×100落射荧光）寻找荧光染色细胞核（作为染色对照）以及细胞质中的小的荧光颗粒。
第3～5天	2. 从肉汤中取0.2ml样本接种至选择琼脂板，观察原培养板。	
第14天	3. 从肉汤中取样本接种选择琼脂板以及观察0天和3～5天接种的培养板。	
第21天	4. 检查肉汤和传代中pH的改变。观测所有培养板，于第28天每板再观察一次后放回至孵育条件中。	
第42天	5. 观察余下的每块板，检查集落形成。	

注：阳性培养以及用于它们培养的培养基，试剂都必须予以丢弃。用某些抗生素有可能消灭细胞系中的支原体［Updoff and Drexler，2004］。然而，完全消灭的成功率低，而且所用的抗生素的毒性作用可能改变细胞的特性。

1.6 其他微生物污染和潜在的生物危害

众多的微生物均可能污染人类干细胞系，筛查所有细胞系是否有这些微生物污染是不切实际的，也很昂贵。干细胞系的未来治疗应用将会要求进行广泛的微生物污染研

究，用这些细胞进行研究的目的是基于必要的谨慎，并且要在任何未经筛查的人细胞中进行。这些措施包括基于这些细胞有关信息的危险性评估，无菌技术的应用，良好的细胞培养操作［Coecke et al.，2005］。一般说来，与这些培养物相关的风险是很低的，然而，这也不可以有任何大意，因为这些细胞出于来源于人类生殖道而可能携带众多不同的病毒（例如疱疹病毒、HIV、乙型肝炎病毒等）。因此细心地评定综合风险（避免用有严重人病原体污染高风险的细胞），做好防范措施（例如使用密封的培养器皿、使用Ⅱ类安全橱［见附录1］），如有感染对细胞培养废液的处理，对新到实验室的细胞培养进行检疫，以及作出评定和基本的质量控制，所有这些措施均可使这种风险降低。

1.7 培养条件、试剂及培养基的质量控制

在干细胞的培养中，有很大可能的变异性和不稳定性，处理这些问题可借助于控制营养和环境对细胞的影响。温度和 CO_2 水平的恒定和监测显然是重要的，尤其在多人使用的实验室，那里的孵箱在工作日期间可能勉强能达到标准的培养条件。同样重要的是，关键培养基和补充物的来源及其组成成分要恒定。此外，任何关键的试剂，诸如小牛血清和血清替代物配方，也很可能每个批次有些差异，因此在常规使用前都必须测试，另外同时要保留一批，以确保它们可以维持细胞良好的生长。

同样重要的是要记住，饲养细胞也可能引起污染，这在原代细胞饲养层培养中的风险最高。为避免这一高污染风险的明智做法是，在实用之前应建立大规模的、可以进行质量控制的（活力、无菌、支原体的检测）饲养细胞冷冻储存库。

1.8 结论

hES细胞系的培养具有挑战性，它们具有不稳定性并易发生变异。对这些细胞的培养方法和干细胞的特征研究仍在发展之中，要设定某些质量控制方法的标准化颇为困难，然而检测细胞库中最常见的污染（细菌、真菌和支原体）对于避免污染在实验室中的扩散至关重要。一旦污染对于实验工作的有效性、质量以及科学数据都有着十分明显的影响。一般的鉴定技术将会很快建立起来，现有的标记可以确定hES典型的表达图型，并且可指示出它们的分化水平。遗传学特征对于确定遗传同一性也是十分重要的。同样它们也可以识别染色体的改变，显示二倍体细胞是否转化而过度生长，从而不再表达hES细胞的所有特征。随着基础科学的发展，审视最新的质量控制方法以及建立更多定量方法进行表型分析十分重要。另外，这也将成为今后建立干细胞治疗的重要因素。

（章静波　译）

参 考 文 献

Andrews, P.W., Przyborski, S.A. and Thomson, J.A. (2001) Embryonal carcinoma cells as embryonic stem cells. In: *Stem Cell Biology* (Marshak, D.R., Gardner, R.L., Gottlieb, D., eds.), pp. 231–265, Cold Spring Harbor Monograph Series, Cold Spring Harbor, NY.

Andrews, P.A., Benvenisty, N., McKay, R., Pera, M.F., Rossant, J., Semb, H., and Stacey G.N., (2005) Commentary: The International Stem Cell Initiative: Towards benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat. Biotechnol.* **23**:795–797.

Bhattacharya B, Cai J, Luo Y, Miura, T Mejido J Brimble S N, Zeng X, Schulz T C, Rao M S, Puri R K. (2005). Comparison of the gene expression profile of undifferentiated human embryonic stem cell lines and differentiating embryoid bodies. *BMC Dev. Biol.* **5**:22.

Buehring GC, Valesco M, Pan CY. (1995). Cell culture contamination by mycobacteria. In vitro *Cell Dev. Biol. Anim.* **31**:735–7.

Cai J, Chen J, Liu Y, Miura T, Luo Y, Loring J, Freed WJ, Rao MS and Zheng X (2006). Assessing self-renewal and differentiation in human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **24**:516–530.

Chen TR, Dorotinsky C, Macy M and Hay R. (1989). Cell identity resolved. *Nature* **340**:106.

Cobo F, Stacey GN, Hunt C, Cabrera C, Nieto A, Montes R, Cortes JL, Catalina P, Barnie A, Concha A. (2005). Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**:1–11.

Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O-W., Price, A., Shechtman, L., Stacey, G., and Stokes, W. (2005). Guidance on Good cell culture practice: a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *ATLA* **33**:261–287.

Del Guidice RA and Gardella RS. (1984). Mycoplasma infection of cell culture: effects, incidence and detection, In: In vitro Monograph 5, Uses and standardisation of vertebrate cell cultures, pp. 104–115, Tissue Culture Association, Gaithersburg MD, USA.

Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. (1999). ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross-contamination at source. In vitro *Cell Dev. Biol. Anim.* **35**:558–559.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **22**:53–4.

Draper, J.S., Pigott, C., Thomson, J.A. and Andrews, P.A. (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* **200**:249–258.

Drexler HG, Hane B, Hu ZB, Uphoff CC. (1993). HeLa cross-contamination of a leukemia cell line. *Leukemia* **7**:2077–2079.

Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLeod RA. (2003). False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines *Leukemia* **17**:416–426.

European Pharmacopeia (2006a). European Pharmacopeia section 2.6.1 (Sterility) (5th Edition), Maisonneuve SA, Sainte Ruffine (www.pheur.org).

European Pharmacopeia (2006b). European Pharmacopeia section 2.6.7 (Mycoplasma) (5th Edition), Maisonneuve SA, Sainte Ruffine.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**:294–9.

Freshney RI (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th Edition, Wiley-Liss, Hoboken, NJ.

Gartler S.M. (1967). Genetic markers as tracers in cell culture. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1967; **26**:167–195.

Gey, G.O., Coffman, W.O. and Kubiek, M.T. (1952). Tissue culture studies of proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**:264.

Gilbert, D.A., Reid, Y.A., Gail, M.H., Pee, D., White, C., Hay, R.J., O'Brien, S.J. (1990). Application of DNA fingerprints for cell line individualisation. *Am. J. Hum. Genet.* **47**:499–517.

Gold M. (1986). A Conspiracy of Cells. State University of New York Press, Albany.

Gooi H.C., Feizi T., Kapadia A., Knowles B.B., Solter D. and Evans M.J. (1981). Stage specific embryonic antigen involves $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* **292**:156–158.

Hampe J., Nurnberg P., Epplen C., Jahn S., Grunow R., and Epplen J.T. (1992). Oligonucleotide fingerprinting as a means to identify and survey long term culture B cell hybridomas and T cell lines. *Hum. Antib. Hybridomas* **3**:186–190.

Harris N.L., Gang D.L., Quay S.C., Poppema S., Zamecnik P.C., Nelson-Rees W.A., O'Brien S.J. (1981). Contamination of Hodgkin's disease cell cultures. *Nature* **289**:228–230.

Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* **270**: 313–21.

Hunt C.J. and Timmons P.M. (2007). Cryopreservation of human embryonic stem cell lines, in: Methods in Molecular Biology vol 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Eds Day JG and Stacey GN, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 259–268.

Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. (1985). Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* **316**:76–79.

Josephson, R., Sykes, G., Liu, Y., Ording, C. J., Xu, W., Zeng, X., Shin, S., Loring, J., Maitra, A., Rao, M. S., and Auerbach, J. M. (2006). A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines. *BMC Biol* **4**:28.

Kannagi R., Nudelman E., Levery S.B., and Hakomori S. (1982). A series of human erythrocyte glycosphingolipids reacting to the monoclonal antibody directed to developmentally regulated antigen SSEA-1. *J Biol. Chem.* **257**:14865–14874.

Kannagi R., Cochran N.A., Ishigami F., Hakomori S., Andrews P.W., Knowles B.B., Solter D. (1983). Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* **2**:2355–2361.

Loring, J.F. and Rao, M.S. (2006). Establishing standards for the characterization of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **24**:145–50.

MacLeod R.A., Dirks W.G., Reid Y.A., Hay R.J., Drexler H.G. (1997). Identity of original and late passage Dami megakaryocytes with HEL erythroleukemia cells shown by combined cytogenetics and DNA fingerprinting. *Leukemia* **11**:2032203–8.

MacLeod R.A.F., Dirks W.G., Matsuo Y., Kaufman M., Milch H., Drexler H.G. (1999). Widespread intra-species cross-contamination of human tumour cell lines arising at source. *Int. J. Cancer* **83**:555–563.

Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassauei K., Sui G., Cutler D.J., Liu Y., Brimble S.N., Noaksson K., Hyllner J., Schulz T.C., Zeng X., Freed W.J., Crook J., Abraham S., Colman A., Sartipy P., Matsui S.I., Carpenter M., Gazdar A.F., Rao M., Chakravarti A. (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **37**:1099–1103.

Masters J.R., Bedford P., Kearney A., Povey S., Franks L.M. (1988). Bladder cancer cell line cross-contamination: Identification using a locus specific minisatellite probe. *Br. J. Cancer* **57**:284–286.

McGarrity, G.I., Vanaman, V., Sarama, J. (1984). Cytogenetic effects of infection of cell culture mycoplasmas: A review. In vitro **20**:1–18.

Mowles J.M., Doyle A., Kearns M.J., and Cerisier Y. (1989). Isolation of an unusual fastidious contaminant bacterium from an adherent cell line using a novel technique. Advances in animal

cell biology and technology for bioprocesses, eds., Spier RE, Griffiths JB, Stephenne J and Crooy PJ, Butterworths & Co., Tiptree, pp. 111–114.

Nannya Y., Sanada M., Nakazaki K., Hosoya N., Wang L., Hangaishi A., Kurokawa M., Chiba S., Bailey D.K., Kennedy G.C., Ogawa S. (2005). A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res.* **65**:6071–6079.

Nelson-Rees W.A., Flandermeyer R.R. et al. (1977). Inter- and intraspecies contamination of human breast tumor cell lines HBC and BrCa5 and other cell cultures. *Science* **195**:1343–1344.

Nelson-Rees, W.A., Daniels, D.W., Flandermeyer, R.R. (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science* **212**:446–452.

O'Brien, S.J., Cliener, G., Olson, R. and Shannon, J.E. (1977). Enzyme polymorphisms as genetic signatures in human cell cultures. *Science* **195**:1345–1348.

Patterson M.K. (1979). Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzymol.* **58**:141–152.

Plaia T.W., Josephson R., Liu Y., Zeng X., Ording C., Toumadje A., Brimble S.N., Sherrer E.S., Uhl E.W., Freed W.J., Schulz T.C., Maitra A., Rao M.S., Auerbach J.M. (2006). Characterization of a new NIH registered variant human embryonic stem cell line BG01V: A tool for human embryonic stem cell research. *Stem Cells* **24**:531–546

Reid Y.A., McGuire L., O'Neill K., Macy M., Chen T.R., McClintock P., Dorotinsky C., Hay R. (1995). Cell line cross-contamination of U-937 [correction of U-397] *J. Leukoc. Biol.* **57**:804.

Reubinoff B.E., Pera M.F., Vajta G., and Trounson A (2001). Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by open pulled straw vitrification method. *Hum. Reprod.* **16**:2187–2194.

Rottem, S. and Naot, Y. (1998). Subversion and exploitation of host cells by mycoplasma. *Trends Microbiol.* **6**:436–440.

Rutzky, C.P., Kaye, C.J., Siciliano, Chao, M., Kahan, B.D. (1980). Logitudinal karyotype and genetic signature analysis of cultures human colon adenocarcinoma cell lines LS180 and LS174T. Can. Res. **40**:1443–1448.

Sparrow R.L., Tippett E.(2005). Discrimination of live and early apoptotic mononuclear cells by the fluorescent SYTO 16 vital dye. *J. Immunol. Methods* **305**:173–87.

Stacey, G.N., Bolton, B.J., Morgan, D., Clark, S.A., Doyle, A. (1992). Multilocus DNA fingerprint analysis of cell banks: stability studies and culture identification in human B-lymphoblastoid and mammalian cell lines. *Cytotechnology* **8(1)**:13–20.

Stacey G.N., Hoelzl, H., Stephenson, J.R. and Doyle, A. (1997). Authentication of animal cell cultures by direct visualisation of DNA, Aldolase gene PCR and isoenzyme analysis. *Biologicals* **25**:75–83.

Stacey, G., Masters, J.R.W., Hay, R.J., Drexler, H.G., MacLeod, R.A.F. and Freshney, R.I. (2000). Cell contamination leads to inaccurate data: We must take action now. *Nature* **403**:356.

Stacey, G. and Doyle, A. (2000). Cell banks: a service to animal cell technology. In: Encyclopedia of Animal Cell Technology Vol. 1, Ed. R. Spier, Wiley-Interscience, pp. 293–320.

Stacey, A. and Stacey, G.N. (2000). Routine quality control testing for cell cultures. In: Methods in Molecular Medicine, Vol. 24: Antiviral Methods and Protocols. Eds. Kinchington D. and Schinazi R.F., Humana Press, Totowa, pp. 27–40.

Uphoff C.C., Drexler H.G. (2004). Elimination of Mycoplasma from infected cell lines using antibiotics. *Methods Mol. Med.* **88**:327–334.

Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G.(1992). Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *J. Immunol. Methods* **149**:43–53.

US Food and Drug Administration (2005a) Title 21, Code of Federal Regulations, Volume 7, revised April 2005, CFR610.12 (Sterility), FDA, Department of Health and Human Services.

US Food and Drug Administration (2005b) Title 21, Code of Federal Regulations, Volume 7, revised April 2005, CFR610.30 (Test for Mycoplasma), FDA, Department of Health and Human Services.

van Helden P.D., Wiid I.J., Albrecht C.F., Theron E., Thornley A.L., Hoal-van Helden E.G. (1988). Cross-contamination of human esophageal squamous carcinoma cell lines detected by DNA fingerprint analysis. *Cancer Res.* **48**:5660–5662.

Vassart G., Georges M., Monsieur R., Brocas H., Lequarre A.S., Christophe D. (1987). A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* **235**:683–684.

Wang H.C. and Federoff S. (1972). Banding in human chromosomes treated with trypsin *Nat. New Biol.* **235**:52–53.

Zhang S., Tsai S., Wu T.T., Li B., Shih J.W., Lo S.C. (2004). Mycoplasma fermentans infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cells in culture. *Blood* **104**:4252–9.

Zhang S., Tsai S., Lo S.C. (2006). Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer* **6**:116.

Zhao X., Li C., Paez J.G., Chin K., Janne P.A., Chen T.H., Girard L., Minna J., Christiani D., Leo C., Gray J.W., Sellers W.R., Meyerson M. (2004). An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.* **64**:3060–3071

Zhou C.Q., Mai Q.Y., Li T. and Zhaung G.J. (2004). Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Chin. Med. J. (Engl.)* **117**:1050–11055.

附录 1 使用Ⅱ类生物安全橱时的某些注意事项

- 使用前需开启一段时间。
- 开始操作前消毒工作台面。
- 当将培养基瓶或别的瓶子递入安全橱内需对它们进行消毒。
- 安全橱内切勿凌乱，或是阻塞格栅（气流）。
- 废弃物与无菌的试剂要分开（例如分别放在工作区的两边），培养及试剂的操作在中心区进行。
- 一次实验只能在安全橱内操作一种细胞系。
- 用毕后将试剂撤去，同时要消毒台面。
- 用毕后仍保持安全橱开始状态一段时间（放回前挡板）。
- 用适当的消毒剂定期彻底地清洗安全橱。

第 2 章　人胚胎干细胞系：衍生与培养

JESSICA A. COOKE and STEPHEN L. MINGER
The Stem Cell Biology Laboratory. Wolfson Centre for Age-Related Diseases，Kings College London. SE1 1UL，UK. Corresponding author：
Stephen. Minger@KCL. AC. UK

2.1 引言

人胚胎干细胞技术的建立预示着一个细胞移植治疗、新药发现和基因组学新时代的到来，特别是，它为产生用作细胞治疗的专一类型细胞库的潜能提供了一种手段，以克服治疗多种人类疾病所需移植物的严重短缺。然而，涉及胚胎干细胞来源所发表的资料很少，迄今为止可用于研究目的的细胞系也非常有限。此外，常规培养人胚胎干细胞还有些技术要求有待解决。所以，在适宜的条件下培养出大量的并且有严格质量控制的人胚胎干细胞前，新的试剂和新的技术必须开发出来，这对于产生大量的用于人类细胞治疗的细胞库是必要的。

本章重点关注人胚胎干细胞来源、特征和常规的培养以及围绕这些细胞生长、增殖和冻存中的一些问题。

2.1.1 人胚胎干细胞诱导与培养

关于人类胚胎干细胞系的建立虽然已经有了少数的报道，但是世界上很多声称衍生出的人胚胎干细胞系并没有严格的特征描述和评估。例如，列于 NIH [http://stemcells.nih/gov/research/registry/ eligibilitycriteria.asp] 干细胞注册协会中的有 78 个细胞系，只有 21 株有正式的特征描述，目前可以用于较广泛的学术交流。为了使 hES 技术的目的能够完全实现，需要更多地发表有关诱导过程、所建细胞系的局限性以及最初的细胞增殖过程的资料。

人胚胎干细胞系一般来源于 6、7 天龄的植入前的胚泡细胞，分离出内细胞团并且在成纤维细胞饲养层上培养 [Thomson et al.，1998；Reubinoff et al.，2000；Park et al 2003；Amit et al.，2003；Mitalipova ey al.，2003；Cowan et al.，2004；Fang et al，2005；Genbacev et al.，2005]，尽管有一篇报道是从第 8 天的体外培养的胚胎中成功地分离出了人胚胎干细胞 [Stojkovic et al.，2004]。上述大多数胚胎是从常规体外受精的志愿者夫妇那里获得的，当然，也有一些人胚胎干细胞系是从专门为此目的而获得的胚胎中诱导出来的 [Lanzendorf et al.，2001]。另外，从怀孕前三个月内选择性终止妊娠还可获得由原始生殖细胞产生的多能性胚胎干细胞系 [Shamlott et al.，1998；Turnpenny et al.，2003]，但是很多情况下，这些细胞在最初的 10～12 代之内就逐渐地失去其多能性 [Turnpenny et al.，2003]。

用于分离胚胎干细胞相对高质量胚胎的其他来源是那些通过植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis，PGD) 筛查的胚胎，植入前遗传学诊断可以确定或可能确定地知道遗传学疾病 [Pickering et al.，2003]。PGD 作为一种出生前诊断手段

[Braude et al. , 2002]，目的在于减少那些具有生殖风险的受孕夫妇们传递严重的遗传疾病。对一群卵裂期胚胎的人胚作细胞活检，并进行体外培养和检测是否存在特殊基因或染色体缺陷，才可使得合适的、没有受到影响的胚胎移植到子宫。很多疾病用这种方法是可以检测出来的，包括脊髓肌肉萎缩 I 型、囊性纤维样病变、镰刀细胞病、Huntington 病，以及各种染色体交互易位和罗伯逊易位。通过性染色体选择胚胎也是可行的方法，常用于严重的 X 染色体连锁疾病，对这类疾病还没有特殊的遗传学测定方法。经过 PGD，被鉴定为高风险的传递疾病或者模棱两可的结果的胚胎有时可能对研究有用（须有病人的知情同意），因为它们来源于有生育力的病人，所以经常是高质量的，并且对分离干细胞有用。到目前为止，已有几个研究组从经过 PGD 诊断的胚胎中获得了特殊疾病来源的人胚胎干细胞系，包括那些编码的囊性纤维样变性 [Pickering et al. , 2005; Mateizel et al. , 2006]、亨廷顿疾病 [Mateizel et al. , 2006; Verlinsky et al. , 2005]、I 型肌强直性萎缩 [Mateizel et al. , 2006; Verlinsky et al. , 2005]，还有一系列 X 染色体连锁疾病的人胚胎干细胞系，包括脆性 X 染色体综合征，脑白质肾上腺萎缩症和 Becker 肌肉营养不良 [Verlinsky et al. , 2005]。

获得初始人胚胎干细胞常用的方法包括将内细胞团从其外围的胚胎滋养层分离出来，一种是通过完全培养基裂解滋养外胚层（参考免疫手术法），另一种偶尔也通过使用激光或玻璃针的物理学方法 [例如，Wang et al. , 2005]。最近也有些报道，不需要分离内层细胞团而是通过将完整的胚泡 [Heins et al. , 2004; Simon et al. , 2005; Genbacev et al. , 2005] 或者是发育早期的桑椹胚 [Strelchenko et al. , 2004] 直接移植到饲养层细胞上而成功地建成了人胚胎干细胞系。

2.1.2　人胚胎干细胞的增殖

人胚胎干细胞生物学发展的最主要制约因素之一就是人胚胎干细胞的增殖，这是非常艰难并且技术要求很高的工作，在目前的条件下，大量培养人胚胎干细胞是不可能的。直到最近，大部分的人胚胎干细胞系仍然是用传统的方法建立，即培养在小鼠胚胎饲养层（MEF，mouse embryonic feeder）上并使用高浓度的非人类血清，大部分可供应用的人胚胎干细胞系需要与 MEFs 共培养，以维持胚胎干细胞的多潜能性和细胞增殖能力并且抑制胚胎干细胞的分化。

满足 hES 与 MEFs 共培养需求的另一种手段是使用 MEF 条件培养基，但是这种方法需要大量的 MEFs 并且还需要使用细胞外基质蛋白来完全抑制 hES 分化 [Xu et al. , 2001]。上述人胚胎干细胞增殖对小鼠胚胎细胞和非人血清的依赖，就出现了一种传播异种病原体的潜在危险，这样便限制了胚胎干细胞系在临床治疗上的应用。替换 MEFs 的一种可能办法就是，用人成纤维细胞作为饲养细胞。最近的几个研究论文表明，hES 细胞系已经能够在人成纤维细胞饲养层上产生，而且不论是动物血清还是人的血清或者是人工合成血清替代品都可以使用。

例如，人胎儿的肌肉和成人的皮肤来源的成纤维细胞这两种细胞都如同 MEFs 一样，能支持 hES 的增殖和维持其多能性，而这些 hES 细胞原先是建立在小鼠的饲养层细胞上的 [Richards et al. , 2003]。更重要地，人胎儿成纤维细胞和人来源的血清也表现出对新产生的人胚胎干细胞的支持作用 [Richards et al. , 2002]，尽管持续使用人的

血清培养，人胚胎干细胞集落在10代之后自发分化的现象已经显现出来［Richards et al.，2003］。人包皮成纤维细胞也可作为人饲养细胞的替代来源，也能够维持先前建立在MEFs上的人胚胎干细胞的增殖和多能性［Amit et al.，2003］。除此之外，与MEFs（4～6代）或者人胎儿成纤维细胞（4～16代）不同，人包皮纤维细胞支持hES细胞增殖不分化的能力可维持40代［Amit et al.，2003］。这些报道之后，有几个研究组成功地在许多不同的人成纤维细胞上建立了新的hES细胞系，包括那些从新生儿的包皮［Inzunza et al.，2005；Lysdahl et al.，2006；Ellerstrom et al.，2006］和胎盘［Simon et al.，2005；Genbacev et al.，2005］中获得的成纤维细胞群。

另一类替代物是来自人胚胎干细胞系本身的类成纤维细胞饲养细胞。这些细胞不仅能够促进先前建立在MEFs上的人胚胎干细胞系的增殖及维持多能性［Stojkovic et al.，2005；Wang et al.，2005］，还可支持新的人胚胎干细胞系的建立［Wang et al.，2005］。

最后，使用动物血清保持人胚胎干细胞增殖的替代物就是使用合成的血清替代品，例如，Invitrogen的删除血清的代用品。很多研究组都表明这种培养基同样可以建立并增殖人胚胎干细胞［参见，例如Lysdahl et al.，2006；Simon et al.，2005；Inzunza et al.，2005；Wang et al.，2005］，但是，这种血清代用品和相关试剂的确切配方通常是得不到的，它们很贵，其中很多仍然含有动物产品，并且仍然要求使用小鼠或人的饲养细胞或者饲养细胞条件培养基以保持胚胎干细胞的多能性。

不管怎么说，为了科学研究和临床治疗诱导产生出人胚胎干细胞并且达到所要求的细胞数量的最佳的条件在于，这些细胞应该能在相对简单的培养条件，即没有饲养细胞、血清添加物和细胞外基质的条件下生长。和人胚胎干细胞不同的是，大多数小鼠胚胎干细胞系能够在不含饲养细胞层的明胶包被的培养皿上生长，只要提供足够浓度的白细胞抑制因子就行（LIF）。人胚胎干细胞在LIF单独存在的条件下是不能增殖的，所以需要鉴别成纤维细胞和其他饲养细胞分泌了哪些能维持人胚胎干细胞多能性的有丝分裂原和生长因子。然而，尽管有不少生物化学和分子生物学的方法可以鉴定这些因子［例如Lin and Bodnar，2002］，但是到目前为止，多能性生长因子的鉴定还是很难捉摸的，虽说Pyle等［2006］已经指出即使不存在MEFs，MEFs分泌的神经调节素（neurotropin）似乎也可以支持人胚胎干细胞多能性的展现。

不过，支持人胚胎干细胞增殖的化学成分限定培养基的研究已经获得了一些进展。细胞外基质（ECM）如Matrigel™［Xu et al.，2001］或层粘连蛋白（laminin）以及来自MEF或人成纤维细胞的条件培养基可以在没有饲养细胞的培养条件下用于人胚胎干细胞的增殖。对于研究染色体核型或者细胞分化这些不需要饲养细胞的细胞实验，这样做就减少了饲养细胞产生的残留物。

Yao等［2006］的研究表明，先前在MEFs上诱导出的hES细胞系能够在没有饲养细胞的Matrigel上，用含有N2和B27神经干细胞补充物以及20ng/ml FGF-2因子的限定培养基继续培养而增殖。这种方法的局限性就是B27补充物的组成并不清楚，并且Matrigel来源于一种小鼠肿瘤细胞系，因此仍然存在异种基因系统。Amit等［2004］发现，在人工合成的血清替代物中联合使用TGF-β1、LIF、FGF-2和纤维素，能够诱导原先那些hES细胞系的多潜能性展现。与此相似，Xu等［2005］发现在血清

替代物中联合使用骨形态构建蛋白拮抗剂 Noggin 和 FGF-2，加之培养于 Matrigel 之上，对于维持原先那些 hES 细胞系的多潜能性具有类似的效力，而其他一些实验组发现无血清化学培养基中的 FGF-2 与活化蛋白（activin），或者与 Nodal 起协同增效作用可保留多能性［Vallier et al.，2005］。Pebay 等［2005］发现 1-磷酸神经鞘氨醇和血小板诱导的生长因子（PDGF）联合使用能够在完全确定成分的培养基中促进 hES 细胞扩增，但是细胞增殖还需要有 Matrigel。Ludwig 等［2006］最近报道了在无饲养细胞条件下并完全是在化学成分培养基中诱导出两个新的 hES 细胞系。然而，其中一个细胞系在培养了 4 个月后检测发现异常的染色体组成（XXY），而另一个细胞系在培养了 7 个月后发现 12 号染色体出现三倍体的现象。提示这种培养基配方对长期支持正常 hES 细胞系增殖可能不是十分恰当。上述配方中的任何一种或者是全部是否可被准许用于建立保留正常的染色体核型的新细胞系仍有待确定。

与小鼠胚胎干细胞相似，人胚胎干细胞集落是密度依赖的，当集落太大时就会自发分化。然而，人胚胎干细胞与大多数小鼠的胚胎干细胞系不同，后者通过蛋白酶消化并稀释到新的 ES 细胞培养基中来进行传代，而对于许多人胚胎干细胞系最佳的培养条件是要通过手工切割的方法：每隔 4～7 天，将胚胎干细胞集落切成 4～8 个小块，再用很细的玻璃吸管吸出一小块并转移到新的 MEFs 上培养。尽管这个过程有体力的要求，而且技术上有难度，但很多实验组包括我们自己都发现，为了能够生长出高质量并且完全未分化的 hES 细胞这是很理想的办法，在传代之后经历自发分化的集落低于总数的 20%。手工方法比酶消化方法进行传代还有一种潜在优点，手工传代方法给 hES 细胞仅仅有很轻微的机械应力。在所有报道了遗传不稳定性的案例中，部分原因很可能就是由于使用了蛋白水解酶进行传代［Draper et al.，2004］，相反，手工传代的方法没有看到人胚胎干细胞核型异常的报道，即使是经过了长时间的传代［Buzzard et al.，2004；Mitalipova et al.，2005］。这一切强调说明，必须对每个 hES 细胞系的核型常规地进行检测，以确保细胞系不能适应于发生染色体变更的培养。当在一套标准的培养条件下生长的 hES 细胞遭遇到培养条件发生显著改变（例如新的培养基配方、新的来源，或者是饲养细胞种类改变）时，便显得格外重要。

2.1.3　人胚胎干细胞的分化

多能性胚胎干细胞不论在体内还是在体外都能够产生多种体细胞类型。在体外，通过评价已经自发分化的集落内的细胞表型，或者通过使细胞生长至汇合而迫使细胞发生分化来论证细胞的多能性。然而，大部分分化的方案是依赖胚胎小体的形成，即胚胎干细胞从饲养细胞层或细胞外基质上移出后所形成的三维细胞聚合体。检测分化集落或胚胎小体内的细胞表型的免疫细胞化学方法或者分子方法通常可以显示来自所有三个胚层的细胞：内胚层、中胚层、外胚层，由此检验各个细胞系的多能性。hES 细胞的常规免疫细胞化学和 PCR 分析，是确认 ES 细胞多能性和分化多衍生性的简单、快速、相对便宜的方法，并且只要细胞培养条件发生重大改变都应该用这种方法进行检测。

在体内论证人胚胎干细胞系多能性的额外检测标准是依赖于把胚胎干细胞注射到免疫缺陷的 SCID 小鼠后形成小的、良性实体瘤（畸胎瘤）。在后续的检测中，如果肿瘤包含的细胞源自所有三个胚层，这个细胞系则被认为是多能性的。对于小鼠的胚胎干细

胞，一种更有意义的检测是把标记的细胞引入到发育中的小鼠胚泡中，把胚胎植入替代携带者，然后检测标记细胞对所产生的嵌合后代中各种器官和组织的贡献。对于人胚胎干细胞，由于伦理学的原因所以后一种途径要避免，因此畸胎瘤检测方法被一些研究组（但并不是所有的研究组）所使用，以证实各个细胞系的多能性。然而，畸胎瘤检测和其他几个直接转移胚胎干细胞的报道都强调，注射未分化胚胎干细胞的潜在有害效果就是产生生长快速的肿瘤。这些观察资料指出必须有一种方法删除被移植细胞中的任何具有潜在危险的 ES 细胞，使移植接受者形成畸胎瘤的风险变低。

2.2 细胞培养基成分

2.2.1 人胚胎干细胞（hES）培养基

BRL-条件培养基（见 2.2.5 节）………… 60ml
BRLM/20FB（见 2.2.4 节）………… 40ml
LIF（ESGRO），1×10^6 U/袋………… 100μl，1000U/ml

2.2.2 人胚胎干细胞玻璃化冻存和解冻的培养基

2.2.2.1 *hES-HEPES* 培养基

含有 Glutamax 的 DMEM，不含丙酮酸钠………… 16ml
ESFBS［ES 级别胎牛血清］………… 4ml
HEPES，1mol/L………… 0.5ml

2.2.2.2 0.2mol/L 蔗糖溶液

蔗糖，1mol/L………… 1ml
hES-HEPES 培养基………… 4ml

2.2.2.3 0.1mol/L 蔗糖溶液

蔗糖，1mol/L………… 0.5ml
hES-HEPES 培养基………… 4.5ml

2.2.2.4 玻璃化培养基，10%

hES-HEPES 培养基………… 2ml
乙二醇………… 0.25ml
DMSO………… 0.25ml

2.2.2.5 玻璃化培养基，20%

hES-HEPES 培养基………… 0.75ml
蔗糖溶液，1mol/L………… 0.75ml
乙二醇………… 0.5ml

DMSO ………………………………………………………………………… 0.5ml

2.2.3　小鼠胚胎饲养细胞培养基（MEFM）

含有Glutamax的DMEM，不含有丙酮酸钠 ………………………… 230ml
FBS ……………………………………………………………… 25ml（10%）
非必需氨基酸，100× ……………………………………………… 2.5ml
2-巯基乙醇，50mmol/L ……………………………… 0.5ml（0.1mmol/L）
L-谷氨酰胺，200mmol/L ………………………………… 2.5ml（2mmol/L）

2.2.4　Buffalo大鼠肝脏细胞（BRL）培养基（BRL-CM）

DMEM（高葡萄糖，无L-谷氨酰胺） ………………………………… 240ml
ESFBS（ES级别FBS） ………………………………………… 60ml（20%）
非必需氨基酸，100× ……………………………………………… 3ml
2-巯基乙醇，14.3mol/L ……………………………… 2.2μl（0.1mmol/L）
用250ml的PES膜过滤系统滤过

2.2.5　BRL-条件培养基

BRL细胞在大鼠肝细胞培养基（BRL-CM）中生长至汇合，用新鲜培养基更换一次，3天后收集这些培养基。

所有培养基用无菌的、孔径0.2μm的PES滤膜过滤，特别是来自其他细胞类型的条件培养基。应该注意的是：在细胞分化研究中可能被用到的生长因子和其他小分子需要无菌准备，但不能过滤，以免这些物质与滤膜结合而被损耗。

2.3　小鼠胚胎饲养细胞（MEF）的制备

最广泛地用于支持hES的饲养层细胞来自小鼠胚胎［Thomson et al.，1998；Reubinoff et al.，2000］，如小鼠胚胎饲养细胞（MEFs），尽管它们可能是最原始的间叶细胞的前体细胞。

每一种hES细胞系在不同的饲养层细胞上的生长可能不同，这点要注意，对于高效率的增殖有些饲养层细胞比另外一些细胞更合适，通常要传5～10代以确保细胞适应于新的饲养细胞。始终要做到只要细胞培养标准条件改变，就要对细胞的核型稳定性和多能性进行严格的核查。方案2.1介绍了原代MEF细胞的分离培养。

2.3.1　原代培养

小鼠胚胎饲养细胞能够从妊娠15.5～16.5天的小鼠胚胎（E15.5～E16.5）中分离出来，培养过程易于生长，是一种可靠的、持续的饲养细胞的来源，并能在液氮中维持很长时间。MEFs通常是在复苏之后2～5天使用。方案2.1是由Nagy等人的方案修改而来［2003］。

方案 2.1 小鼠胚胎饲养细胞（MEFs）的原代培养

试剂与材料

无菌或无菌制备

- ☐ MEFM（见 2.2.3）
- ☐ 无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 磷酸盐缓冲液（PBSA）
- ☐ 胰蛋白酶，0.25%，用 GIBCO 溶液 A 配制（参见 2.9 节）
- ☐ 乙醇 70%
- ☐ 75cm² 培养瓶
- ☐ 10cm Petri 培养皿，塑料的，非组织培养级别
- ☐ 带螺盖的离心管，15ml 和 50ml
- ☐ 用于解剖的镊子和解剖刀（使用之前高压消毒并保存在 70%酒精中）
- ☐ 可更换的解剖刀片，11 号

非无菌

- ☐ 计时妊娠鼠，15.5～16.5 天（经典常用的小鼠品系包括 SV129 和 C57BL）

步骤

(a) 处死妊娠 15.5～16.5 天的小鼠。

(b) 用 70%酒精擦洗鼠的腹面。

(c) 剪开皮肤和组织暴露子宫。

(d) 取出子宫角并放到含有 PBSA 的 10cm Petri 塑料皿里。

(e) 用解剖刀从胚囊中取出胚胎，丢弃其他所有的组织包括胎盘以及胎膜。

(f) 取出含有脑组织的头的上部并丢弃。

(g) 沿着从头到尾的中轴从幼崽前端开始切开胚胎进行解剖，暴露及丢弃内部器官。

(h) 把胚胎剩余部分放在 50ml 离心管里用 PBSA 洗 4 遍。

(i) 把胚胎剩余部分转入干净的 10cm Petri 皿中，去掉 PBSA，把胚胎用新的解剖刀切成 2mm 大小的小块。

(j) 把切碎的胚胎放到 15ml 离心管里，加入 10ml 0.25%的胰蛋白酶，在 37℃孵育 10～20min。

(k) 使小块沉淀下来，从孵育管中取出 5ml 胰蛋白酶以及分散的细胞，并且放到无菌的 50ml 的离心管里。

(l) 加入等体积的 MEFM 抑制胰蛋白酶活性。

(m) 再加入 5ml 0.25%胰蛋白酶到原先的含有胚胎的 15ml 离心管里，并在 37℃再孵育 10～20min。

(n) 重复步骤（k），（l），（m），大约进行 5 次孵育，将所有加入的胰蛋白酶以及

分散的细胞放入同一个 50ml 离心管。只有没溶解的软骨将被留在原先的含有胚胎的 15ml 管中。

(o) 用力地分散胰蛋白酶消化的细胞悬液并允许剩余的小块沉淀。

(p) 取出并保存上清液，去除沉淀。

(q) 离心上清液，1000g，5min。

(r) 用 10ml MEFM 重悬沉淀并用台盼蓝计数活细胞数量。

(s) 每个 160cm^2 培养瓶接种 5×10^6 细胞，再加入 10ml MEFM。

(t) 在 37℃、5%CO_2 温箱里孵育过夜。

(u) 第二天，用 20ml 的新鲜的 MEFM 培养基置换旧的培养基以去除细胞的碎片。

(v) 在冻存之前使细胞长到 80%～90%汇合。

注意：要确保 MEFs 细胞完全没有被任何微生物所污染，每次从小鼠胚胎新制备 MEFs，要在无抗生素的培养基中至少连续传 15 代，在这个时期如果没有观察到微生物污染，那么早期传代的细胞就可以扩增，并大量分装冻存起来，随后能够安全地用于日常 hES 细胞的增殖。

2.3.2 MEFs 的继代培养

为了维持细胞库的供应以及避免出现先前讨论过的细胞衰老，关注 MEFs 的传代次数是关键。简而言之，应该以较低传代次数（p0～p2）的细胞用于维持细胞库，以较高传代次数（p3 和 p4）的细胞用于制备无活性的可支持 hES 细胞的饲养层。MEFs 细胞在 4 代以后不能使用，这很重要，因为这个时期细胞已经衰老并可能很难扩增了。

MEFs 将在 75cm^2 或 225cm^2 的组织培养瓶中生长，这主要取决于需要多少饲养细胞（MEFs）。在制备饲养层细胞板时，一个 75cm^2 培养瓶的 MEFs 如果灭活时达到 80%汇合，就可以为 2～6 个 4 孔培养板提供细胞。一个 225cm^2 培养瓶的 MEFs 可用于大量储存细胞或者用来制备大量无活性的饲养层细胞板。在进行 hES 细胞培养工作之前，有必要准备好充足的细胞储备供应，要确保饲养细胞不短缺。用 225cm^2 培养瓶的大量传代将提供更快的 MEFs 细胞储备，因此方案 2.2 讨论了一个 225cm^2 培养瓶的 MEFs 细胞传代的容量问题。为了工作容量进行传代，可将一个 75cm^2 的培养瓶平均分为 3 份，而每个 225cm^2 培养瓶的 MEFs 细胞应该按 1∶3 的比例再产生三个 225cm^2 培养瓶的 MEFs 用于储备。

方案 2.2　小鼠胚胎饲养细胞（MEFs）的传代

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 0～3 代的 MEFs 大约 80%汇合，75cm^2 或 225cm^2 培养瓶

☐ MEFM（见 2.2.3）

☐ 明胶（高温高压灭菌，0.1% *W/V*

□ 胰蛋白酶，0.25%，溶于 GIBCO 溶液 A（见 2.9 节）
□ PBSA
□ 台盼蓝活性染色
□ 离心管，15ml
□ 组织培养瓶，3×225cm²
□ 血细胞计数板

步骤

(a) 从 225cm² 培养瓶中吸出培养基并用 10ml 的 PBSA 洗一次细胞。

(b) 加 3ml 的胰蛋白酶并在 37℃孵育细胞 4min。

(c) 从孵箱里取出培养瓶并轻轻地敲击使 MEFs 进一步脱离培养瓶。

(d) 加入 6ml 的 MEFM，打散所有细胞确保没有粘连并防止成团。

(e) 将培养基和悬浮细胞转入 15ml 离心管中。

(f) 离心 5min，1000*g*。

(g) 把 5ml 0.1%明胶加入 3 个新的无菌的并将有 MEFs 传入的 225cm² 的培养瓶中，室温下与凝胶最少孵育 5min。

(h) 从离心管中取出 MEFs 并吸出培养基，敲击管壁分散细胞沉淀，用 3ml 新鲜的 MEFM 重悬。用吸管吹散细胞以确保细胞是单细胞悬液，这对于传代培养瓶中细胞的均一生长是必要的。

(i) 从每个新的培养瓶中吸出 5ml 0.1%明胶，加入 25ml MEFM 培养基。

(j) 把 3ml 的 MEFs 分配到 3 个 225cm² 培养瓶中。

(k) 每个 225cm² 培养瓶中的细胞在下次传代时将继续分 3 份。

来自前三代的 MEFs 细胞（p0～p3）的每一代都能冻存起来维持细胞的储备或者被传代为 hES 细胞的增殖提供饲养细胞（见 2.3.5 节）。

4 代之后，MEFs 应该被丢弃因为这些细胞可能衰老或发生改变。

2.3.3 冻存小鼠胚胎饲养细胞

如果 MEF 细胞要用于 hES 细胞的培养过程，那就必须维持大量的、高质量的、不同代（p0～p4）的 MEFs 冷冻贮存。传代次数早的细胞（p0～p2）应该作为细胞储备的种子细胞，它们可以继续传代，再次冻存以提供大量的更高代次的细胞（p3～p4）来维持 hES 细胞的日常生长。一个 75cm² 培养瓶有 80%汇合的 MEF 细胞将冻存产生一个冻存管的储备细胞，一个 225cm² 培养瓶的细胞将冻存产生 3 个冻存管的储备细胞。

方案 2.3 小鼠胚胎饲养细胞的冻存

试剂与材料

无菌或无菌制备

□ 含有 MEFs 细胞的 75cm² 培养瓶或 225cm² 培养瓶，p0～p4，80%～90%细胞汇合

☐ MEFM（见 2.2.3 节）
☐ 胰蛋白酶，0.25%，EDTA，溶于 GIBCO 溶液 A（见 2.9 节）
☐ ESFBS
☐ DMSO
☐ PBSA
☐ 离心管，15ml
☐ 冻存管

步骤

(a) 从含有 MEFs 细胞的培养瓶中去除培养基，并用 PBSA 洗一遍，每个 $75cm^2$ 培养瓶用 5ml。

(b) 每个 $75cm^2$ 培养瓶中加入胰蛋白酶 1ml，确保整个培养瓶的单层细胞都能被覆盖，37℃孵育 4min。

(c) 轻轻地敲打培养瓶使细胞进一步脱落。加入 5ml MEFM 终止胰蛋白酶反应，吹散 5～6 次确保所有细胞没有粘连并防止成团。把含有 MEFs 的培养基转入 15ml 离心管。

(d) 离心 5min，1000*g*。

(e) 为冻存准备冻存管及写标签。标签内容应该包括 MEFs 细胞新传代的代次，日期和任何可能需要的信息。在无菌条件下将 100μl DMSO 加入备好的冻存管里。

(f) 吸去上清，小心不要搅乱细胞沉淀。

(g) 用 ESFBS 重悬细胞沉淀，每个 $75cm^2$ 培养瓶加 900μl，用塑料吸管打散细胞，确认细胞沉淀已混匀。

(h) 把含有 MEFs 细胞的 ESFBS 转移到装有 DMSO 的冻存管里，立即储存到 −80℃ 冰箱过夜，储存之前要彻底混匀。

(i) 第二天，把冻存管放到液氮里长期保存。

2.3.4　MEFs 细胞的复苏

从长期液氮保存中复苏 MEF 细胞，用于补充 MEFs 的储备或者用于灭活处理后支持未分化 hES 细胞的生长。

方案 2.4　复苏冻存的小鼠胚胎饲养细胞

试剂与材料

无菌或无菌制备
☐ 一支 MEFs 冻存管
☐ MEFM（见 2.2.3 节）
☐ 明胶，0.1%（高温高压灭菌）

☐ 组织培养瓶，$75cm^2$
☐ 水浴箱，设置在 37℃
☐ 吸管，1ml

步骤

(a) 在 $75cm^2$ 培养瓶内加 3ml 0.1%明胶，覆盖细胞将要黏附的表面，室温孵育至少 5min。

(b) 从液氮罐中取出一支 MEFs 冻存管。

(c) 在 37℃水浴箱中快速解冻细胞。

(d) 把 0.1%明胶从 $75cm^2$ 培养瓶中吸出并加入 7ml 的 MEFM 培养基。

(e) 用 1ml 吸管把含有 MEFs 细胞的 ESFBS/DMSO 混合液从冻存管里转移到含有 MEFM 培养基的 $75cm^2$ 培养瓶中。

(f) 在 37℃孵育细胞过夜。

(g) 第二天早上用新鲜的 MEFM 培养基替换 7ml 培养基去除残留的 DMSO 和细胞碎片。

(h) MEFs 细胞生长达 5 天或细胞汇合达到 80%，每 2 天换一次液。

2.3.5 基于化学方法的 MEFs 细胞失活

MEFs (p0～p4) 是一种快速分裂的细胞，因而在作为饲养细胞层使用之前需要抑制有丝分裂避免其过度生长。细胞分裂的抑制可通过放射和化学阻断方法获得，最普遍的是使用丝裂霉素 C，它是一种为日常培养 hES 细胞而准备 MEFs 细胞的简单、有效的方法。

安全提示： 对丝裂霉素 C 进行操作时一定要当心，因为它有遗传毒性。始终要戴手套，并且只能在 II 类通风橱（小的生物安全柜）内操作。

hES 细胞的增殖需要使 MEF 细胞失活，一个 $75cm^2$ 培养瓶大约 80%汇合的 MEFs 细胞通常能提供 2～4 个（取决于 MEFs 细胞的产量）4 孔板。方案 2.5 讨论了一个 $75cm^2$ 培养瓶或一个 $225cm^2$ 培养瓶的 MEFs 细胞的失活处理，使用 $225cm^2$ 培养瓶需要 3 倍试剂和培养基。

方案 2.5 小鼠胚胎饲养细胞的生长抑制

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 80%～90%汇合的 MEFs 细胞，$75cm^2$ 培养瓶（或 $225cm^2$）
☐ MEFM（见 2.2.3 节）
☐ 胰蛋白酶，0.25%，溶解于 GIBCO 溶液 A（参见 2.9 节）
☐ PBSA

□ 明胶，0.1%
□ 丝裂霉素 C（MMC），50μg/ml，溶解于 DMEM（过滤除菌）
□ 多孔培养板，4 孔：通常每 $75cm^2$ 培养瓶的 MEFs 细胞需要 1～4 个培养板
□ 吸管
□ 离心管，15ml

步骤

(a) 用 MEFM 以 1∶10 稀释 MMC，从 50μg/ml 稀释至 5μg/ml。

(b) 在 4 孔培养板的每个孔中加入 0.5ml 的明胶。

(c) 从孵育箱里取出 $75cm^2$ 培养瓶，内有 80%汇合生长的 p3 或 p4 代的 MEFs 细胞。

(d) 用 10ml 的 5μg/ml MMC，在 37℃孵育 MEFs 细胞 2h。

注意：因为制备的 MEF 细胞可能有变化，新的使用者将要确定 MMC 完全抑制细胞分裂的最佳浓度和孵育时间。

(e) 在 MMC 孵育的期间，把 0.1%明胶涂到 4 孔板，至少在使用前 5min 涂板。

(f) 用 MMC 处理完之后，用 5ml 的 PBSA 洗细胞一次。

(g) 加 1ml 胰蛋白酶，于 37℃孵育 4min。

(h) 轻轻地敲击培养瓶使所有的细胞脱落，并加入等体积的 MEFM 终止胰蛋白酶反应，转移到 15ml 的离心管。

(i) 在含有 MEFs 细胞的 15ml 离心管里加入 MEFM 培养基使总体积达到 6ml，1000g 离心 5min。

(j) 吸去上清，用 5ml 的 MEFM 重悬 MEF 细胞沉淀，仔细确认是单细胞悬液。

(k) 用血细胞计数板计数细胞。

(l) 从 4 孔板吸掉明胶。

(m) 每个孔以 7.5×10^4 个接种 MEFs 细胞，并且每个孔中 MEFM 的总量达到 500μl。MEFs 细胞将在 6h 内贴壁。

(n) 把新接种的培养板放到孵育箱里，准备第二天使用。

注意：MEF 细胞在失活之后死亡之前，能够作为 hES 细胞的饲养细胞来使用的时间为 7 天，理想的情况是把 hES 细胞传到 MEFs 细胞失活 1～3 天内的培养板上。

2.4　人胚胎干细胞的诱导

在美国，使用人胚胎干细胞进行研究的相关信息可以在国家健康研究中心（NIH）网上查到（http://stemcells.nih.gov）。在英国，人类受精卵和胚胎学权威机构（HFEA，http://www.hfea.gov.uk）为所有的人胚胎干细胞分离研究项目颁发许可证。这些权力机构不仅负责颁发许可证，而且还要监督所有正在进行的人胚胎干细胞研究项目确实在遵守严格的指导方针。人胚胎干细胞的分离需要和协助受精者紧密合作而获得胚胎，最近制定的法律规定，为了得到胚胎捐赠，禁止向捐赠人提供经济的或者医

疗的诱惑，并需要捐赠的夫妇两人提供完整信息并签署知情同意书。

2.4.1 胚胎

到目前为止，全世界范围内只有很少数的实验室能够建立人胚胎细胞系。部分原因可能是由于胚胎质量决定着是否适合于做研究及干细胞分离。在辅助生殖的治疗过程中，质量好的胚胎需要给受孕治疗的病人使用，较差一点的胚胎经常冻存起来为病人的后期使用，剩下最差的胚胎因为不适合给受孕治疗的病人使用，所以捐赠用于研究[Pickering et al.，2003]。

通过植入前遗传学诊断（PGD）筛查已知遗传学疾病的胚胎是获得高质量胚胎的另一条途径。PGD能够用于诊断含有单基因遗传疾病的胚胎，并具有高度的准确性，经常是从8个细胞阶段的体外受精卵中得到单个细胞，再通过多聚酶链反应（PCR）扩增DNA来检测[Braude et al.，2002]。如果有影响，就捐献用于研究，所以PGD胚胎还能提供高质量的但却是遗传突变的胚胎，可用于建立特殊疾病的细胞系。

2.4.2 胚胎发育概要

关于体外人胚胎发育有详细记载[Pickerig et al.，2003]。简而言之，人的胚胎从受精卵细胞快速生长到胚泡阶段大约是受精后的5～6天。在胚泡阶段，内细胞团能够被分离并用于hES细胞诱导[Bongso et al.，1994]。

2.4.3 免疫外科法

提高建成hES细胞系可能性的最有效方法之一，是通过免疫外科法从外围的胚胎滋养层分离出内细胞团（ICM）。这是一种需要一定技巧的方法，通常要由胚胎学家来完成，包括使用动物来源的酶产品溶解胚胎滋养层并释放出ICM。分离ICM的另一个方法是通过使用激光，它可以避免胚胎暴露于动物产品[De Vos and Steirteghem，2001]。

然后，ICM能够在体外培养于MEFs之上直到公认的干细胞系形成。方案2.6描述了伦敦皇家学院干细胞生物学实验室建立5种新的hES细胞系的技术。

方案 2.6　人胚胎干细胞系的建立

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 5～6天的人胚泡，经HFEA允许，并且像先前讨论的完全经病人同意。HFEA所要求的全部细节能够在HEFA的网站找到（http//:www.hfea.gov.uk）。

☐ 链霉蛋白酶，0.5%，溶于DMEM

☐ 抗人抗体，30%～50%

☐ 含有Glutamax的DMEM

☐ hES培养基（见2.2.1节）

☐ 豚鼠的补体，用 DMEM 1∶1 稀释

☐ 4 孔培养板的每个孔以 7.5×10^4 的细胞数接种新的失活的 MEFs，含有 500μl hES 培养基

☐ 大孔吸管

步骤

(a) 使胚胎生长到胚泡阶段，通常大约 5 天。

(b) 如果胚胎没有从透明圈里孵出，用 5～10μl 的 0.5%链霉蛋白酶在 37℃孵育直到透明圈溶解。

(c) 将无透明圈的胚泡与抗人抗体孵育 10min，此抗体用含有 Glutamax 的 DMEM 稀释 30%～50%。

(d) 在孵育之后，用 hES 培养基短暂地冲洗胚泡使抗人抗体失活。

(e) 用 5～10μl 20%的豚鼠补体与胚泡在 37℃孵育 5～15min，目的是溶解胚胎滋养层，此时用大孔吸管轻轻吹吸胚胎将有助于溶解过程。

(f) 当胚胎滋养层完全溶解，用吸管轻轻地取出完整的内层细胞团并立即转移到含有 500μl hES 培养基的 MEFs 培养板上。

(g) ICM 细胞 2～5 天内将贴壁，要每天观察细胞的生长。要在原位停留 15 天以上，如果需要，可以添加新的灭活的 MEFs（只有当集落大到足以传代时才能将它转到新的 MEFs 培养板上）。

(h) 从 ICM 来源的细胞具有类干细胞的形态，通常出现在集落的中心。

(i) 当克隆达到约 0.1～0.5mm 大小时，用拉长的玻璃吸管将它们切割成 2～10 小块并转移到 2～4 孔新的失活的 MEFs 培养板中（见方案 2.7）。这个过程每 5～7 天重复一次。

(j) 在新建立的 hES 细胞系前几次传代之后，hES 细胞的增殖就可按以下方案进行（见 2.5 节）。

注意：一旦超过单一集落，初建的 hES 细胞系的团块每一代都要冻存直到获得了大量冻存成功的冻存管（见 2.6 节）。前 10～15 代最少 50%的细胞将被冻存直到细胞系被很好的建立。

2.5　人胚胎干细胞的增殖

到目前为止，大部分可用的 hES 细胞系都是在扶持细胞生长的饲养层上衍生及维持。如前所述，MEFs 是最常用的饲养层细胞，但有一些人的饲养细胞也常被用作支持细胞。一些人造的基质可用于分离及维持 hES，虽然到目前为止大部分用做支持 hES 细胞的基质并非完全不含动物产物。

hES 的传代是一个相当容易的过程，如果细胞生长在饲养层上，掌握好制备生长抑制的饲养层细胞的时机，对于维持 hES 细胞集落处于最好的未分化状态是很重要的。经典的做法是，hES 细胞必须每 5～7 天传代至新鲜饲养层上。传代可通过机械法，即：

使用拉长的玻璃吸管或玻璃球操作，或通过使用酶的化学处理法，例如使用胶原酶或0.25%的胰蛋白酶。hES细胞需要每隔一天换一次液，中间补充一次。

适合于hES细胞繁殖最简单的途径是建立一个培养及传代的周计划，下列一组方案讨论了hES细胞的日常维持。

2.5.1 在MEF细胞上培养及日常饲养程序

在MEFs上培养hES细胞需要适时与配合，以保证MEF板在hES细胞需要传代时是经灭活处理并可用的。每批MEFs细胞在培养过程中表现的行为不同，在使用前要扩增，并用hES细胞测试，了解其全部特性。经典的做法是：星期四复苏MEF细胞，下周的星期一或星期二进行灭活处理，星期四或星期五可进行hES细胞的传代。表2.1是一个周计划示例。

表 2.1 一周细胞维持的日程安排示例

天	细胞维持		
	MEF细胞	hES细胞	
		传代	**饲养常规程序**
星期一	灭活及接种	—	饲养
星期二	—	传代	补充
星期三	—	—	饲养
星期四	解冻复苏	如果需要	补充
星期五	再饲养	—	饲养
星期六	—	—	双倍加液
星期日	—	—	—

注：此日程安排可修改以适合于各实验室，应确保新鲜的饲养细胞经过了灭活处理，为hES细胞的传代做好了准备，所有细胞都有一定的饲养常规程序。实验室对hES细胞的需求量决定了传代的间隔，细胞饲养（feeding）就是需要完全更换新鲜培养基（即每孔500μl），而补充（Supplement）就是要在每个孔中再加半量培养基（即每孔250μl）。

2.5.1.1 hES细胞的培养

传代后第1天，必须加入250μl新鲜的培养基（不吸去旧的培养基）使hES细胞贴附于MEFs。如果细胞不能维持那么长时间，例如从星期六到星期一，就要加双倍培养基（即每孔1000μl新鲜hES培养基）。

2.5.1.2 hES细胞的传代

hES细胞传代过程包括将未分化的集落切割成小块，转移至新的饲养层或基质上使细胞进一步生长。这种培养方法通过促进自我更新使细胞维持在不分化的状态。操作可采用手工技术，例如用拉细的玻璃吸管切割集落，或用玻璃球挑动集落（见第3、6章），也可采用化学试剂或酶（例如胶原酶Ⅳ，见方案2.8）使细胞从饲养层上脱落。

手工传代 这种方法是用拉细的玻璃吸管将hES细胞集落切割成小块，可以在一个集落内精确地选择未分化细胞。手工传代还可减少发生遗传选择的倾向，反复使用酶或化学试剂处理细胞可能出现遗传选择［Suemori et al.，2006］。但这种方法需要付出

体力，依赖于高超的技巧，对质量的要求高，因而无法用于大批量细胞培养。

方案 2.7　hES 细胞的手工传代

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 生长于 MEF 之上的未分化的 hES 细胞集落

☐ 新鲜的 MEF 板（最好是在失活处理后 1～3 天内）

☐ hES 培养基（见 2.2.1 节）

☐ 50μl 加样器枪头

☐ 玻璃巴氏吸管

非无菌

☐ 100μl 加样器，可调节的，调至 50μl

☐ 火焰裸露的气体燃具或类似设备

☐ 解剖用倒置显微镜，最好有一个可设定 37℃ 的加热台，放在 II 级层流罩中使用。

步骤

(a) 所有工作在无菌条件下进行，使用外科面具、手套，穿实验室外套。

(b) 首先，用 500μl hES 培养基置换新鲜 MEF 培养板内的 MEF 培养基。

(c) 点燃煤气灯，用蓝色火焰烧玻璃吸管，轻轻旋转玻璃吸管，待柔软时拉长吸管产生比头发丝还要细的、密封的狭窄末端（图 2.1）。

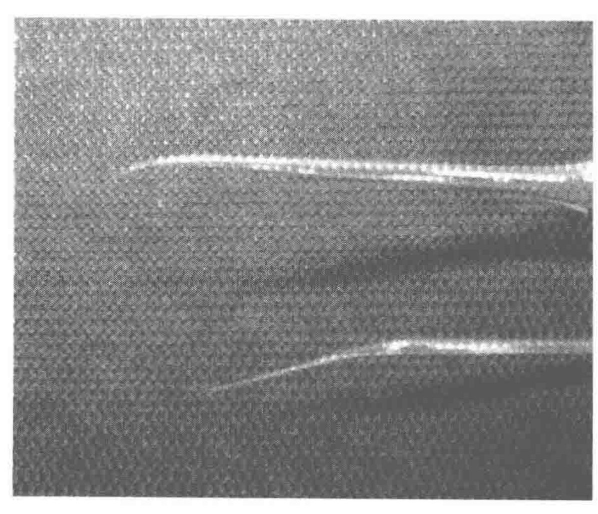


图 2.1　拉好的玻璃吸管

要探究各种不同的拉好的吸管，发现最佳的，例如，吸管尖端是直的或是弯的。

(d) 马上将所有拉好的吸管置于层流罩内保持无菌，吸管只能在传代时现拉，以减少污染的危险。

(e) 从温箱中取出 hES 细胞培养皿放在加热的台子上。

(f) 根据它们的外观选择集落的未分化区域，未分化的 hES 细胞小而圆，紧密而透明。要避免选取棕色细胞区域（图 2.2），这个区域的细胞正处于自发分化状态。

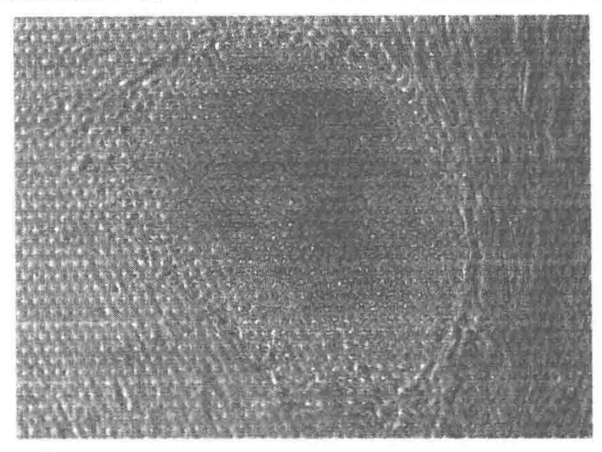


图 2.2　典型的 hES 细胞集落。未分化细胞在集落的周边，围绕着中心具有褐色外观的分化的细胞

(g) 用一个拉好的吸管的尖端，沿着未分化细胞区域切下，再切成较小的均等的块儿。典型的集落大小类似于图 2.2 中所示，根据 hES 细胞系所特有的再生长率，可切割成 6～10 块。

(h) 集落被切割后，用加样器安上合适的枪头吸取自由漂浮的小团块。

(i) 将集落的团块转移至新的 MEF 皿中，作为参考指南，一个新鲜的 MEF 孔中可等量分配 4～6 个较小的团块。

(j) 小心地将新旧 hES 细胞培养皿放回温箱中，必须静置过夜，不能搅动，要使细胞贴附，不要聚集在皿的中央。

(k) 第二天在新旧培养皿中再加入 250μl hES 培养基，这样提供培养基可以降低全量换液吸去未贴附细胞的危险性。

注意：为了避免污染，每次伸入一个孔都要用新拉制的无菌的吸管。

hES 细胞的酶法传代　细胞反复暴露于酶，可能出现遗传改变，虽然必须注意这个问题，但这种方法适合于 hES 细胞的大批量培养。

方案 2.8　用胶原酶进行 hES 细胞的传代

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 生长于 MEF 之上的未分化的 hES 细胞集落

☐ 新鲜的 MEF 板（最好是在失活处理后 1～3 天内）

☐ PBSA
☐ hES 培养基
☐ 溶解于 PBSA 的胶原酶Ⅳ溶液（200U/ml）
☐ 细胞刮或拉长的玻璃吸管（见方案 2.7）
☐ 机械加样器和吸头
☐ 离心管，15ml

步骤

(a) 吸去 hES 皿中的培养基，四孔板中的每一个孔用 500μl PBSA 洗两次。

(b) 每孔加入 500μl 胶原酶Ⅳ溶液，37℃孵育 8～10min。

(c) 用一个拉长的玻璃吸管轻轻地分离集落。

(d) 用机械加样器将细胞转移至无菌的 15ml 离心管中。

(e) 用 750μl 新鲜的 hES 培养基淋洗 hES 培养板，将所有细胞集落收集到同一离心管中。

(f) 用加样器在 15ml 离心管中将集落打碎形成 10 块或更多的小块。

(g) 750*g* 离心 2min。

(h) 小心吸去上清，用 5ml 新鲜 hES 培养基重悬细胞。

　i) 在新鲜 MEF 板的每个孔中，沿四周接种 4～6 个团块。

　ii) 将新接种的 hES 细胞放入温箱中，贴附过夜，第二天加入新鲜的 hES 培养基。

2.6　hES 细胞的冻存

与其他许多细胞相同，人胚胎干细胞可以长期储存于液氮中。虽然其他干细胞都可以通过常规的慢冻（1℃/min）速溶方法（见第 6、9、10 章）成功地冻存，但到目前为止，冻存 hES 细胞最常用的方法是玻璃化方法。

2.6.1　hES 细胞的玻璃化

这种方法通过逐步增加蔗糖和 DMSO 冷冻液的浓度来保护细胞，减少细胞内的冰晶形成。溶解的步骤非常相似，就是通过逐步降低蔗糖和 DMSO 冷冻液的浓度，从而使细胞慢慢恢复到标准的 hES 培养基中。

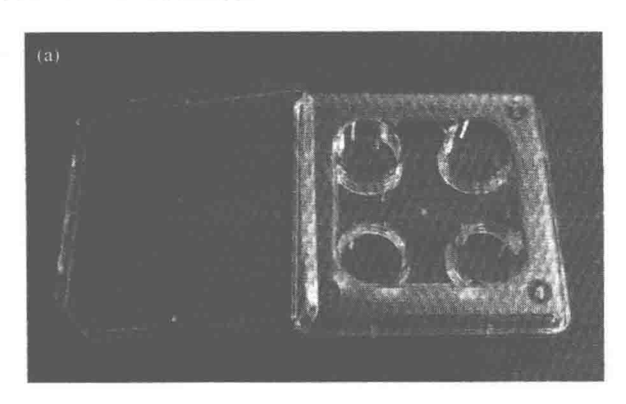
方案 2.9　采用玻璃化方法冻存 hES 细胞

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 生长于 MEF 饲养层之上的未分化的 hES 细胞

☐ hES-HEPES 培养基（见 2.2.2.1 节）
☐ 10%玻璃化溶液（见 2.2.2.4 节）
☐ 20%玻璃化溶液（见 2.2.2.5 节）
☐ 多孔板，4 孔（图 2.3a）
☐ 开口拉长的玻璃化小管（图 2.3b）
☐ 冷冻管，4.5ml
☐ 拉长的玻璃吸管（见方案 2.7，hES 细胞的手工传代）
☐ 加样器枪头，80μl
☐ 配有大孔针头（14G）的注射器



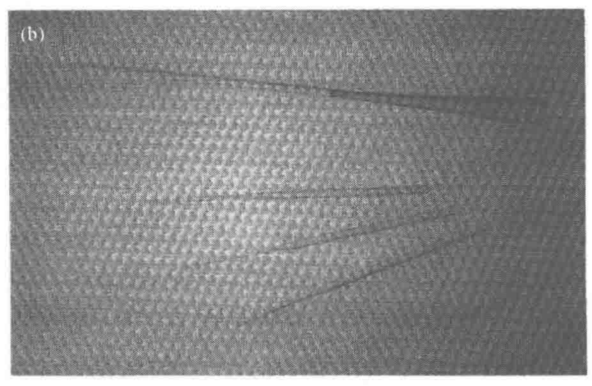


图 2.3

非无菌
☐ 加样器，设置在 80μl
☐ 倒置解剖显微镜，有一个可加热至 37℃的台子，放在 II 级层流罩中。
☐ 装满液氮的粗颈真空液氮罐
☐ 长臂的镊子
☐ 取液氮用的适宜安全设备

步骤

(a) 准备一个玻璃化板（见图 2.3a）

孔 1：hES-HEPSE 培养基，1ml

孔 2：空白

孔 3：10%玻璃化溶液，1ml

孔 4：20%玻璃化溶液，1ml

朝上的盖子：10μl 20%玻璃化溶液

(b) 使用前将板置于温箱中 2min，预温。

(c) 将 hES 细胞系的名称、代数、时间以及其他相关信息预先写在 4.5ml 冷冻管上。

(d) 将大孔注射器针头放在燃气灯上小心加热，用它在 4.5ml 冷冻管的顶部和底部戳一个洞，使液氮可以在管内自由流动，这有助于保持细胞在保存过程中一直是冷冻状态。

(e) 将 hES 集落切割成小块，大小约两倍于传代所需的团块。小的集落团块经不住融化步骤，因此在大批冻存前，要测定每个 hES 细胞系团块的大小是否正确。

(f) 将 6～8 块集落小块转移至孔 1 中，60s。

(g) 用加样器将所有集落小块从孔 1 转至孔 3，精确计时 60s。

(h) 将集落小块从孔 3 转至孔 4，精确计时 30s。一定要精确计时，因为在非冷冻状态下 DMSO 溶液对细胞有毒性。

(i) 将集落小块转移至 10μl 小滴中。

(j) 用一个加样器，在吸头的末端安上玻璃化小管（见图 2.3b），小心但迅速地将含有集落小块的溶液吸入。

(k) 小心移去吸头，用一对长臂镊子将小管稍微倾斜浸入液氮，使细胞瞬间冷冻。

(l) 一旦冻住（约 5～10s），就将小管放入 4.5ml 冷冻管，再放回液氮中。

(m) 当液氮充满冷冻管时，将存有小管的 4.5ml 冷冻管放入长期保存的液氮储存器中，用于日后复苏。

2.6.2　解冻 hES 细胞

hES 细胞的解冻速率具有很大可变性，因此最好是“经验操作”，确定冻存集落的最适大小，获得解冻之后的最大的再生长。

方案 2.10　解冻玻璃化冻存的 hES 细胞

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 一小管冷冻的 hES 细胞集落小块，最好放在一个可移动的液氮容器内。

☐ MEF 板（最好在用前失活处理 1～3 天）

☐ hES-HEPES 培养基（见 2.2.2.1 节）

☐ 蔗糖溶液，0.1mol/L（见 2.2.2.3 节）

☐ 蔗糖溶液，0.2mol/L（见 2.2.2.2 节）
☐ 多孔板，4 孔（图 2.3a）
☐ 80μl 加样器枪头

非无菌
☐ 加样器，设置在 80μl
☐ 倒置解剖显微镜，有一个可加热至 37℃的台子，放在 II 级层流罩中。
☐ 装满液氮的隔热容器
☐ 长臂镊子
☐ 取液氮用的适宜安全设备

步骤

(a) 如图 2.3 所示准备及预温解冻板：
孔 1，蔗糖，0.2mol/L …………………………………………………… 1ml
孔 2，蔗糖，0.1mol/L …………………………………………………… 1ml
孔 3 和孔 4，hES-HEPES 培养基 ……………………………………… 1ml/孔
(b) 从长期液氮储存器中取一个冷冻管放入一个便携式液氮容器中。
(c) 用镊子取一个 hES 细胞的小管，放入层流罩中。
(d) 快速操作，用手指压住小管的上端，将狭小的末端浸入含有 0.2mol/L 蔗糖的孔 1 中。
(e) 只要冻存物一融化，就要立即取出 hES 细胞团块放至蔗糖溶液中（用加样器排出所有剩余溶液）。
(f) 精确孵育 60s，而后转入孔 2（0.1mol/L 蔗糖）中。
(g) 在孔 2（0.1mol/L 蔗糖）中孵育 60s。
(h) 将细胞转移至孔 3（hES-HEPES），5min。
(i) 解冻的最后一个步骤，将细胞转移至孔 4，5min。
(j) 经过最后一个步骤之后，用加样器收集 hES 细胞接种于 MEFs，如前所述（见方案 2.7）。

2.7　hES 细胞的特性鉴定

hES 细胞系的分子及生物化学特性必须得到证实，并确认其多能性和正常性（即未转化）。最初的特性要尽快了解，只要新的细胞系建立，细胞可繁衍之后就可进行。所有细胞系在常规培养过程中，如果培养条件改变或为了证实由于长期传代而没有发生主要的遗传适应性改变（这可能预示着染色体的改变），都要进行常规特性鉴定。

在培养过程中有几方面的因素会影响干细胞的性质，包括：长期传代、酶和化学药物的处理、培养基成分的改变。因此，大约每传 10 代或在培养条件改变之后，都应该对已建立的 hES 细胞系进行特性分析。

hES细胞系完整的特性分析包括：检测细胞表面标志物的表达和已知hES基因的表达，分析每个细胞系的染色体组成。随后的小节将介绍三种鉴定hES细胞系的主要方法：免疫细胞化学用于检测细胞表面标志物，PCR用于检测多能基因表达图谱，核型分析用于检测染色体组成。然而，应当注意的是还有其他方法也可用于鉴定，包括端粒重复长度、碱性磷酸酶研究，以及畸胎瘤在免疫缺陷动物体内的形成［进一步的讨论见Carpenter Rosler，and Rao，2003］。

2.7.1　hES细胞的免疫细胞化学特性

用于鉴定未分化hES细胞的表面标志物组合可识别细胞表面表达的特异性蛋白或糖类。未分化hES细胞的共有标志物包括：属于红细胞系列的糖脂抗原的阶段特异性抗原1（SSEA-1）、SSEA-3和SSEA-4［Kannagi et al.，1983］，属于硫酸角蛋白相关抗原（Trafalgar抗原）的TRA-1-60和TAR-1-81［Andrews et al.，1984］。其他标志物，如POU转录因子OCT-4在多潜能细胞群体包括未分化的hES细胞中也表达［Rosner et al.，1990］，而且已观察到OCT-4的表达对于维持ES细胞的多能性是必需的［Nichols et al.，1998；Boyer et al.，2005］，因此OCT-4表达的缺失可作为分化的标志［Loh et al.，2006］。

干细胞标志物可通过免疫细胞化学（ICC）染色来鉴别，可利用显色或荧光抗体，可使用显微镜或流式细胞仪。方案2.11介绍了ICC方法，这是一种简单的筛选方法，因为它是鉴别hES相对便宜和快捷的途径，不需要流式细胞仪也可进行。

方案2.11　通过荧光免疫细胞化学分析hES细胞的特性

试剂与材料

无菌或无菌制备

- □ 生长于0.1%明胶包被的玻璃盖玻片上的hES细胞

非无菌

- □ 4%多聚甲醛
- □ PBSA
- □ Tris-缓冲盐溶液（TBS^-）
- □ 含有0.5%Triton X-100的Tris-缓冲盐溶液（TBS^+）
- □ 奶粉，5% *W/V*，去离子水（dH_2O）配制
- □ 一抗：SSEA-1、-3、-4、TRA-1-60、-1-81及OCT-4
- □ 适宜的二抗
- □ 封片剂，如Fluorosave
- □ 吸气器和吸液管
- □ 铝箔

☐ 纸板染色盘

☐ 可置于 24 孔板的玻璃盖玻片

☐ 平板摇床（可选择）

☐ 荧光显微镜和相机

步骤

第 1 天

(a) hES 细胞可生长于 MEF 饲养层细胞上一起染，因为 MEFs 不会表达任何 hES 细胞的标志物。一个 24 孔板要接种 5×10^5 个经丝裂霉素 C 灭活的 MEFs，种在 0.1% 明胶包被的 13mm 玻璃盖玻片上，如前所述（方案 2.5）。

(b) 在固定之前，hES 细胞最好要传代至有 MEF 细胞的盖玻片上生长 2～3 天，以使细胞贴附并生长成单层，每一种抗体至少要用两孔 hES 细胞进行染色。

(c) 从生长着 hES 细胞的盖玻片上吸去 hES 培养基，用 500μl PBSA 洗一次。

(d) 用 4%的多聚甲醛固定 30～40min。

(e) 吸去固定液，用 500μl PBSA 洗一次。

(f) 每孔加入 500μl TBS^+，室温孵育 15min，最好放在平板摇床上摇，吸液时要小心，不要碰掉细胞。

(g) 吸去 TBS^+，重复步骤（f）4～5 遍，以保证细胞被彻底清洗。TBS^+ 也使细胞渗透性增加，使抗体染色更充分。

(h) 清洗结束时，用 500μl 溶解于去离子水的 5%奶粉溶液孵育细胞 30～60min，以阻断非特异性的抗体结合。

(i) 在此孵育过程中，根据供应商的提示，用 5%奶粉溶液稀释好一抗。

(j) 吸去奶粉溶液，重复洗的步骤（f）4～5 次，已保证除去所有非特异性结合的抗体。

(k) 每孔用 250～500μl 相应的一抗-5%奶粉溶液孵育，室温过夜。最好放在平板摇床上摇，或者要确认细胞已被浸没。

注意：*加液和吸液时要小心谨慎，以避免抗体的交叉污染。*

第 2 天

(a) 吸去一抗溶液，每一种抗体用不同的吸头以避免交叉污染。

(b) 用 TBS^- 洗细胞，每孔 500μl。

(c) 用 TBS^- 孵育细胞，每孔 500μl，15min，放在平板摇床上。

(d) 吸去 TBS^-，重复步骤（c）4～5 遍，以保证除去一抗。

(e) 在清洗孵育过程中，可用 TBS^+ 配制相应的二抗，每孔需要 250～500μl 抗体—TBS^+ 溶液，根据是否使用平板摇床来决定加的量（250μl 或 500μl）。

注意：*如果使用 DNA 荧光染色显示核，要在这时阅读步骤（g）。*

(f) 清洗结束时，吸去 TBS^- 溶液，每孔加 250～500μl 抗体-TBS^+ 溶液孵育细胞，放在平板摇床上，室温孵育至少 1h。

(g) Hoechst 33258 或 DAPI 可用于显示 hES 细胞的核，可能要以适宜的浓度加入到二抗溶液中，可与二抗溶液一起孵育。

(h) 用相应的封片剂封片，如 Fluorosave。

(i) 用荧光显微镜和照相设备观察之前，要让片子彻底干燥。

注意：所有的二抗以及用二抗孵育的板都要用铝箔包起来，以防被日光漂白。

2.7.2 通过聚合酶链反应（PCR）分析 hES 细胞的特性

PCR 可使少量 DNA 扩增到足以进行电泳的量。这种鉴别方法可以检测如 OCT-4 和 Nanog 这类只在未分化 hES 细胞中表达的基因。逆转录酶-PCR（RT-PCR）是一种可以利用分离的信使 RNA（mRNA）构建互补 DNA（cDNA）的方法。从 hES 细胞分离 RNA 最简单的途径是使用 RNA 提取试剂盒。RT-PCR 就是将逆转录酶、游离的核苷、反应缓冲液以及作为模板的提取 RNA 混合在一起产生出 cDNA，随后再用这个 cDNA 与未分化 hES 细胞基因的相应引物进行标准的 PCR。

方案 2.12 RT-PCR 合成 hES 细胞的 cDNA

试剂与材料

无菌或无菌制备

- ☐ 几小块 hES 细胞集落，按照与常规传代相同的方法制备（见 2.5.1.2 节）。

非无菌

- ☐ RNA 提取试剂盒，如 RNAeasy
- ☐ 5×AMV-RT Superscript enzyme
- ☐ 缓冲液：含 10mmol/L $MgCl_2$ 的 AMV-RT
- ☐ 引物：oligo $(dT)_{18}$，2μg/μl
- ☐ 引物：oligo $(dN)_{10}$，2μg/μl
- ☐ 核苷：dNTPs，2mmol/L
- ☐ 核糖核酸酶抑制剂：RNasin
- ☐ 模板：提取的 RNA，2μg
- ☐ 无 RNA 酶的水
- ☐ 设置在 70℃的加热块
- ☐ PCR 热循环仪
- ☐ 加样器和吸头
- ☐ 冰

步骤

(a) 使用 RNA 提取试剂盒，按照制造商的说明书从 hES 细胞制备 RNA 模板。

(b) 准备 RT-PCR 的预混液：

dNTPs，2mmol/L ………………………………………… 1μl

Xoligo (dT)$_{18}$ …… 1μl
oligo (dN)$_{10}$ …… 1μl
RNA 模板 …… 2μg
无 RNA 酶的水 …… 5μl
总体积 …… 10μl

(c) 加热预混液至 70℃，3min。

(d) 加热之后立即将预混液放在冰上迅速冷却以防止稳定的二级结构形成。

(e) 在预混液中加入：

5×AMV-RT 缓冲液 …… 4μl
RNasin（防止 RNA 降解） …… 1μl
总预混液体积 …… 15μl

(f) 取出 2μl 最终预混液作为标准 PCR 的阴性对照。

(g) 在预混液中加入 1μl AMV-RT 酶

(h) 立即转移至热循环仪，进行下列单循环：

37℃ …… 10min
42℃ …… 30min
52℃ …… 20min
80℃ …… 10min

(i) 热孵育之后，新合成的 cDNA 模板必须用无 RNA 酶的水稀释 5 倍，准备用于标准 PCR。

(j) 最终的 cDNA 样品可保存于－20℃。

方案 2.13　通过 PCR 分析 hES 细胞的基因表达

试剂与材料

无菌或无菌制备

☐ 几小块 hES 细胞集落，按照与常规传代相同的方法制备（见 2.5.1.2 节）。

非无菌

☐ 10×*Taq* 缓冲液（标准液是 25mmol/L $MgCl_2$）
☐ *Taq* DNA 多聚酶
☐ dNTPs，2mmol/L
☐ RT-PCR 合成的 cDNA 模板
☐ 高压消毒的 dH_2O
☐ 琼脂粉
☐ 溴化乙啶
☐ 5×上样染料
☐ 溴化乙啶缓冲液，50mmol/L：

dH_2O …… 380ml
TBE，1mol/L …… 20ml
溴化乙啶 …… 20μl

- □ DNA梯形标准品，带的大小在200碱基对（bp）至700bp
- □ PCR热循环仪
- □ 电泳槽和电泳仪，设置在100V
- □ 人未分化基因引物：

OCT-4正义引物：5′-GAA GGT ATT CAG CCA AAC-3′
OCT-4反义引物：5′-CTT AAT CCA AAA ACC CTG G-3′
OCT-4的DNA大小预计为：650bp
Nanog正义引物：5′-CAG AAG GCC TCA GCA CCT AC-3′
Nanog反义引物：5′-CTG TTC CAG GCC TGA TTG TT-3′
Nanog的DNA大小预计为：216bp

- □ 内对照基因，人β-肌动蛋白引物：

正义：5′-ATT GGC AAT GAG CGG TTC CG-3′
反义：5′-AGG GCA GTG ATC TCC TTC TG-3′
β-肌动蛋白的DNA大小预计为：211bp

步骤

(a) 制备每套引物的预混液，总量20μl，典型配方：

10×*Taq*缓冲液 …… 2μl
2mmol/L dNTPs …… 2μl
cDNA模板 …… 2μl
*Taq*多聚酶 …… 0.5μl
正义引物 …… 1μl
反义引物 …… 1μl
dH_2O …… 11.5μl
总体积 …… 20μl

(b) 将样品放在PCR热循环仪中，按照下列循环条件进行：

94℃ …… 40s（变性）
55～60℃ …… 40s（退火，检查引物的解链温度）
72℃ …… 60s（延伸）
循环30～40次
72℃ …… 5min（二级结构最小化）

(c) 待循环完成后，配制含溴化乙啶的1.5%的琼脂胶：

i) 50ml dH_2O中加入7.5g琼脂。
ii) 用微波炉小心加热直至琼脂溶解。提醒：胶非常热，要穿保护的衣服，包括戴手套和护目镜。
iii) 小心加入5μl溴化乙啶，混匀。

iv）将一个梳子放入 PCR 胶的模具中，将热的混合物轻缓地灌入。注意不要产生气泡，因为气泡会妨碍 DNA 在胶中的迁移。

v）拔梳前置室温 30min，使胶冷却直至凝固，放在电泳槽中，以 50mmol/L 溴化乙啶缓冲液覆盖之。

(d) PCR 循环完成后，将样品从循环仪中取出。

(e) 每个样品中加 5μl 上样染料，将样品加至胶中，确认同时加了 β-肌动蛋白阳性对照样品以及 DNA 梯形标准品。

(f) 开始电泳，100V，30～40min，直到 DNA 梯形标准品已经清楚地分开，在紫外灯下很容易区分。

(g) 用一个 UV-透视器（波长 315nm）看胶，如果需要，用相机拍照。

(h) 将每一个样品的所有 DNA 片段与 DNA 梯形标准品相比较，观察是否有预期的带（前已述及），β-肌动蛋白阳性对照样品也要被证实已经显示。

(i) 预期大小的 DNA 条带可以用洗胶试剂盒（如 GENECLEAN®）很容易提取出来，并且应该通过测序来证实。

2.7.3 hES 细胞的染色体核型分析

hES 细胞的核型分析对于确定任何新分离的细胞系的性别以及总的染色体组成是必需的，也是确定在扩增传代或改变培养条件后是否发生染色体畸变的一种手段。通常是通过染色体 Giemsa (G)-带技术来进行，G-带就是将铺展的染色体用蛋白酶短暂处理一下，可用于检测染色体异常，包括易位、缺失及单个染色体的重复或丢失。与大多数其他的人细胞相同，hES 细胞是二倍体，应该是 46 XX 或 46 XY。因为核型分析是高度专业的工作［见如 Rooney and Czepulkowski，2001］，所以通常是送到专业的遗传研究实验室或当地医院的细胞遗传实验室进行，此处就不再做进一步详细介绍（见第 1 章）。

2.8 利用 hES 细胞进行分化研究

人胚胎干细胞源自内细胞团，因此具有被诱导分化成所有细胞类型的潜能［进一步的讨论见 Asahara et al.，2000］。hES 细胞的这种性质使它们成为进一步了解分化控制的理想细胞群体，使我们可以洞察发育过程中各种细胞类型如何被特化，什么信号或机制控制着细胞命运的决定，而了解这些的最终目的是为各种人类疾病的治疗提供细胞群体来源。

2.8.1 hES 细胞分化概要

hES 细胞的定向分化可通过表观遗传学或遗传学方法完成。表观遗传学方法是利用添加生长因子（有丝分裂原）、接触因子（如细胞外基质），或与其他细胞类型共培养，来促进 hES 细胞的命运决定［Schuldiner et al.，2000；Watanabe et al.，2005］。遗传学方法是通过病毒载体转染引进特殊基因，这些基因被认为可以调节某个特殊命运决定［Kanda et al.，2004；Vicario and Schimmang，2003］。在正常胚胎发育过程中是

表观遗传和遗传相结合的模式起作用，使得区域命运特化及细胞特性同一化，产生不同的细胞类型 [Pevny，1998]。或许这就是在体外条件下，遗传及表观遗传因素的结合可增加产生（例如）ES 衍生的神经细胞的原因。

不论采用哪种方法，进行整个分化过程的第一步都是形成 Ebs。不只是将 hES 细胞从饲养层上挪开（尽管必须注意一些饲养层细胞可能会继续起作用），通过让细胞漂浮，不与可能会影响细胞命运的 MEFs 接触，也有助于启动分化。

2.8.2　胚胎小体形成

已经在 MEF 饲养层上生长的 hES 细胞，如果是单个分散的细胞很难存活，为了启动分化程序，必须将它们从饲养层上挪开，以细胞团块的方式漂浮，典型大小约 300～500 个细胞，不要让它们附着在表面。当这些细胞转移到一个适当的细胞外基质上 (ECM)，分化作用就在这团细胞内启动了，其性质取决于已加入的生长因子或已转入的基因，出现的细胞生长结果为非典型 hES 细胞。

方案 2.14　由 hES 细胞产生胚胎样小体

试剂与材料

无菌或无菌制备

- ☐ 生长于 MEFs 之上的未分化的 hES 细胞集落
- ☐ 加样器，设置在 50μl
- ☐ 超低附着力的 Petri 培养皿（特殊包被过的皿，可防止细胞附着；见 2.9 节），2.6cm。
- ☐ 拉长的玻璃吸管（见方案 2.7）

非无菌

- ☐ 带有 37℃加热台的解剖显微镜

步骤

(a) 在超低附着力的 Petri 培养皿中加入 2～3ml hES 培养基。

(b) 从温箱中取出未分化的 hES 细胞，放在解剖显微镜的加热的台子上。

(c) 用拉长的玻璃吸管（见方案 2.7）将集落切成小块，块的大小大约与 hES 细胞手工传代切的大小（300～500 个细胞）相同，要小心解剖，只取未分化的细胞。

(d) 当集落的所有合适的区域都被分离，得到足够的细胞小块时，收集所有漂浮的小块转移至低附着力的培养皿中，细胞团块而后将形成自由漂浮的细胞球体——胚胎小体 (Ebs)（图 2.4）。

(e) 第二天早上检查一下这些 Ebs，确认它们没有贴附在皿底，如果贴附了，可以用拉长的玻璃吸管小心地使它们移动，可以自由漂浮。

(f) 在标准 hES 培养基中孵育这些 Ebs 3～5 天，每天补充 1ml 培养基。

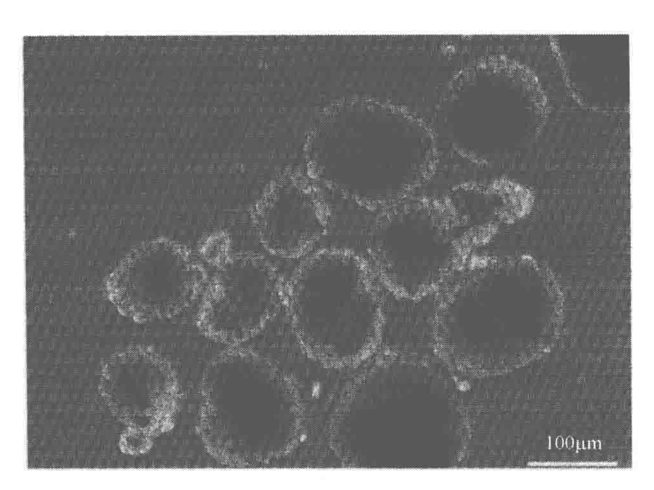


图 2.4　自由漂浮的 Ebs

典型的每个团块含有 300～500 个细胞。

(g) 为了启动细胞的分化，用加样器将细胞转移至含有合适的分化培养基以及 ECM 包被液的 6 孔培养板或 75cm^2 培养瓶中。

2.9　材料来源

项目	供应商
琼脂	Sigma
抗体：SSEA-1、-3、-4，TRA-1-60、-1-81，OCT-4	Chemicon；Santa Cruz (OCT-4)
第二抗体	Abcam；Chemicon；Santa Cruz
抗人抗体	Sigma
BRL 细胞	ECACC
AMV-RT 缓冲液，含 10mmol/L $MgCl_2$	Promega
离心管	Corning
胶原酶Ⅳ	Invitrogen (GIBCO)，Sigma
冷冻管，4.5ml	Corning
培养瓶	Corning
DMEM	Invitrogen (GIBCO)
dNTPs，2mmol/L	Promega
DMEM，含 Glutamax，不含丙酮酸钠	Invitrogen (GIBCO)
ES 级别的 FBS (ESFBS)	Autogen Bioclear
ESGRO (10^6 单位) 鼠科的 LIF	Chemicon
溴化乙啶	Sigma
胎牛血清	Autogen Bioclear
Fluorosave	Calbiochem-Novabiochem

续表

项目	供应商
胶洗脱试剂盒	Q-BIOgene
明胶	Sigma
GENECLEAN ®	Q-BIOgene
Glutamax	Invitrogen
豚鼠补体	Sigma
HEPES	Invitrogen（GIBCO）
L-谷氨酰胺	Invitrogen（GIBCO）
上样染料，5×	Promega
Matrigel™	BD Biosciences
2-巯基乙醇	Invitrogen（GIBCO）
丝裂霉素 C（MMC）	Sigma
多孔培养板	Nuce，VWR
非必需氨基酸	Invitrogen（GIBCO）
核苷：dNTPs，2mmol/L	Promega
oligo（dN)$_{10L}$	Promega
oligo（dT)$_{18}$	Promega
PES 膜过滤系统	Corning
引物：Oligo（dT)$_{18}$；Oligo（dN)$_{10L}$	Promega
链霉蛋白酶	Sigma
核糖核酸抑制剂：RNasin	Promega
RNA 提取试剂盒	Q-BIOgene
RNA 提取试剂盒，如 RNeasy	Q-BIOgene
无 RNA 酶的水	Qiagen
灭菌滤器，PES	Corning
Superscript 酶：5×AMV-RT Superscript 酶	Promega
Taq 缓冲液，10×	Promega
Taq DNA 多聚酶	Promega
Tri 缓冲盐溶液	
台盼蓝	Invitrogen
胰蛋白酶，1∶250，0.25%，用溶液 A 配制	Invitrogen（GIBCO）25050-014
超低附着力的 Petri 培养皿	Corning
玻璃化作用小管	LEC Instruments

（王艳辉　陈实平　译）

参考文献

Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J. Anat.* **200**:225–232.

Amit, M., Shariki, C., Margulets, V. and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* **70**:837–845.

Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., and Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* **68**:2150–2156.

Andrews, P.W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.* **103**:285–293.

Asahara T, Kalka C, Isner JM. (2000). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* **7**:451–7.

Bongso, A., Fong, C., Ng, S. and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum. Reprod.* **9**:2110–2117.

Boyer, L. A., Lee, T.I., Cole, M.F., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**:1–10.

Braude, P., Pickering, S., Flinter, F., and Ogilvie, C.M. (2002). Preimplantation genetic diagnosis. *Nat. Rev. Genet.* **3**:941–953.

Buzzard, J.J., Gough, N.M., Crook, J.M., and Colman,A. (2004). Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat. Biotechnol.* **22**:381–382.

Carpenter, M.K., Rosler, E. and Rao, M.S. (2003). Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* **5(1)**:79–88.

Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., and Melton, D.A. (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* **350**:1353–1356.

De Vos, A., Van Streirteghem, A. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagn.* **21**:767–780.

Draper, J., Pigott, C., Thomson, J. and Andrews, P. (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* **200**:249–258.

Draper, J.S., Moore, H.D., Ruban, L.N., Gokhale, P.J. and Andrews, P. W. (2004). Culture and characterisation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **13**:325–336.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **22**:53–54.

Ellerstrom, C., Strehl, R., Moya, K., Andersson, K., Bergh, C., Lundin, K. and Semb, H. (2006). Derivation of a xeno-free human ES cell line. *Stem Cells* **24**:1–28.

Fang, Z.F., Jin, F., Gai, H., Chen, Y., Wu, L., Liu, A.L., Chen, B., and Sheng, H.Z. (2005). Human embryonic stem cell lines derived from the Chinese population. *Cell Res.* **15**:394–400.

Genbacev, O., Krtolica, A., Zdravkovic, T., Brunette, E., Powell, S., Nath, A., Caceres, E., McMaster, M., McDonagh, S., Li, Y., Mandalam, R., Lebkowski, J., and Fisher, S.J. (2005). Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil. Steril.* **83**:1517–1529.

Heins, N., Englund, M.C., Sjoblom, C., Dahl, U., Tonning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**:367–376.

Inzunza, J., Gertow, K., Stromberg, M.A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S.,

hrlund-Richter, L., and Hovatta, O. (2005). Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* **23**:544–549.

Kanda, S., Tamada, Y., Toshidome, A., Hayashi, I. and Nishiyama, T. (2004). Over-expression of bHLH genes facilitate neural formation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22(3)**:149–156.

Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S-I, Andrews, P.W., Knowles, B.B., Solter, D. (1983). Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* **2**:2355–2361.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S-J. and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* **444**: 481–5.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M.D. and Lanza, R. (2005). Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* **365**:1636–1641.

Lanzendorf, S.E., Boyd, C.A., Wright, D.L., Muasher, S., Oehninger, S., and Hodgen, G.D. (2001). Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil. Steril.* **76**:132–137.

Lee, J. B., Lee, J.E., Park, J.H., Kim, S.J., Kim, M.K., Roh, S.I. and Yoon, H.Y. (2005). Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol. Reprod.* **72**:42–49.

Lim, J.W. and Bodnar, A. (2002). Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* **2**:1187–1203.

Loh, Y-H., Wu, Q., Chew, J-L. et al. (2006). The OCT-4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **38(4)**:431–434.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., Llanas, R.A., and Thomson, J.A. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**:185–187.

Lysdahl, H., Gabrielsen, A., Minger, S.L., Patel, M.J., Fink, T., Petersen, K., Ebbesen, P., and Zachar, V. (2006). Derivation and characterization of four new human embryonic stem cell lines: the Danish experience. *Reprod. Biomed. Online* **12**:119–126.

Mallo, B.S., Park, K-Y., Chen, K. G., Hamilton, R.S. and McKay, R.D.G. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**:1063–1075.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Ryceke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod.* **21**:503–511.

Mitalipova, M., Calhoun, J., Shin, S., Wininger, D., Schulz, T., Noggle, S., Venable, A., Lyons, I., Robins, A., and Stice, S. (2003). Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* **21**:521–526.

Mitalipova, M.M., Rao, R.R., Hoyer, D.M., Johnson, J.A., Meisner, L.F., Jones, K.L., Dalton, S., and Stice, S.L. (2005). Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**:19–20.

Miyamoto, K., Hayashi, K., Suzuki, T., Ichihara, S., Yamada, T., Kano, Y., Yamabe, T. and Ito, Y. (2004). Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**:433–440.

Nagy, A., Getenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. (2003). Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Third edition. Cold Harbor Spring Laboratory Press.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K. et al. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factors Oct-4. *Cell* **95**:379–391.

Odorico, J.S., Kaufman, D.S., and Thomson, J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **19**:193–204.

Park, J.H., Kim, S.J., Oh, E.J., Moon, S.Y., Roh, S.I., Kim, C.G., and Yoon, H.S. (2003). Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol. Reprod.* **69(6)**:2007-14.

Pebay, A., Wong, R.C., Pitson, S.M., Wolvetang, E.J., Peh, G.S., Filipczyk, A., Koh, K.L., Tellis, I., Nguyen, L.T., and Pera, M.F. (2005). Essential roles of sphingosine-1-phosphate and platelet-derived growth factor in the maintenance of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**:1541–1548.

Pevny, L.H., Sockanathan, S., Placzek, M. and Lovell-Badge, R. (1998). A role for Sox1 in neural determination. *Development* **131**:5512–5525.

Pickering, S.J., Braude, P.R., Patel, M., Burns, C.J., Trussler, J., Bolton, V. and Minger, S. (2003). Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. *Reprod. Biomed. Online* **7(3)**:353–364.

Pickering, S.J., Minger, S.L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C.J., Ekonomou, A., and Braude, P.R. (2005). Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reprod. Biomed. Online* **10**:390–397.

Pyle, A.D., Lock, L.F., and Donovan, P.J. (2006). Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat. Biotechnol.* **24**:344–350.

Reubinoff, B.E., Pera, M., Vajta, G. et al. (2001). Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum. Reprod.* **16**:2187–2194.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**:399–404.

Richards, M., Fiong, C-Y., Chan, W-K., Wong, P-C. and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **20**:933–936.

Richards, M., Tan, S., Fong, C.Y., Biswas, A., Chan, W.K., and Bongso, A. (2003). Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **21**:546–556.

Rooney, D.E., and Czepulkowski, B.H. (2001). Human Cytogenetics, A Practical Approach: Constitutional Analysis. Oxford University Press, Oxford, UK.

Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K. et al. (1990). A POU-transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**:686–692.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A. and Benvenisty, N. (2000). The effects of eight different growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97(21)**:11307–12.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13726–13731.

Simon, C., Escobedo, C., Valbuena, D., Genbacev, O., Galan, A., Krtolica, A., Asensi, A., Sanchez, E., Esplugues, J., Fisher, S., and Pellicer,A. (2005). First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. *Fertil. Steril.* **83**:246–249.

Smith, A.G. and Hooper, M.L. (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **121**:1–9.

Stojkovic, M., Lako, M., Stojkovic, P., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Herbert, M., Hyslop, L., Ahmad, S., Murdoch, A., and Strachan, T. (2004). Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* **22**:790–797.

Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., and Stojkovic, M. (2005). An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**:306–314.

Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukharenko, V., and Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* **9**:623–629.

Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N. (2006). Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**:926–932.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [published erratum appears in *Science* 1998 Dec 4;**282(5395)**:1827]. *Science* **282**:1145–1147.

Turnpenny, L., Brickwood, S., Spalluto, C.M., Piper, K., Cameron, I.T., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2003). Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. *Stem Cells* **21**:598–609.

Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R.A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **118**:4495–4509.

Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukharenko, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod. Biomed. Online* **10**:105–110.

Vicario, I. and Schimmang, T. (2003). Transfer of FGF-2 via HSV-1 based amplicon vectors promotes efficient formation of neurons from embryonic stem cells. *J. Neurosci. Methods* **123(1)**:55–60.

Wang, Q., Fang, Z.F., Jin, F., Lu, Y., Gai, H., and Sheng, H.Z. (2005). Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* **23**:1221–1227.

Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watnabe, Y., Mizuseki, K. and Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat. Neurosci.* **8(3)**:288–296.

Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**: 971–974.

Xu, R.H., Peck, R.M., Li, D.S., Feng, X., Ludwig, T., and Thomson, J.A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat. Methods* **2**:185–190.

Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A., and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:6907–6912.

第3章 人EC和ES细胞神经分化技术

JAMIE P. JACKSON, PETER D. TONGE, and PETER W. ANDERWS
Centre for Stem Cell Biology, University of Sheffield, Western Bank, Sheffield, UK.
Corresponding author: p. w. Andrews@sheffield. Aac. uk

3.1 引言

胚胎干（embronic stem，ES）细胞和它的恶性对应细胞——胚胎癌（embryonal carcinoma，EC）细胞是可以满足多种研究神经分化标准的细胞系。它们分裂迅速，易于转染，并能分化成为包括神经细胞在内的多种细胞类型。由于它们的多潜能性和不受控制的自发分化能力，ES 细胞培养物具典型的异源性。此外，ES 的培养条件要求苛刻，常需要饲养层细胞或昂贵的生长因子。相反，EC 细胞潜能较低，也易于大量培养，大多不需要饲养层细胞，并且仅要求相对简单的培养基，此外其培养物异源化的程度也较低，故易于标准化（见第 6 章）。因此，采用 EC 细胞比 ES 细胞的研究更容易重复，更具说服力，也易于解释。但是，EC 细胞的不利因素是它们是肿瘤细胞，比较适合肿瘤生长，遗传结构是异常的，并且分化能力减弱，因此得出重要结论时应谨慎。总之，EC 细胞能提供一个研究 ES 细胞生物学特性的简化工具和策略。

由于 EC 细胞是具有异常核型，并且较 ES 细胞潜能较低的一类肿瘤细胞，因此，有人认为一旦获得 ES 细胞的时候，以 EC 细胞作为实验工具就显得多余了。但是另一种观点认为它们尚有独特的实验优越性，是 ES 细胞很好的补充。ES 细胞的多潜能性使得它们作为实验研究工具时既具有优点同时也有明显的缺点。在分化前，ES 细胞的最初群体会影响诱导分化的结果。假如未分化的细胞群体包含许多未被注意到的自发分化细胞，这样就导致重复结果的差异。相反，EC 细胞不发生自发分化，这使得实验重复性更好。

NTERA2 细胞系在神经分化相关研究中经常用到，这主要是因为当暴露于视黄酸后，它们很容易产生有丝分裂后神经元，而后者能生长出与原代培养的神经元相似的细长神经轴突［Andrews，1984；Pleasure et al.，1992］。对小鼠 ES 细胞的研究常能为人类的 ES 细胞行为研究提供有价值的认识，但是种系之间存在着许多重要的差异，这就突出了使用动物模型作为指导的重要性，而不是基于它们所提出的假设。

当研究 ES 细胞向神经前体细胞和终末分化细胞分化过程的时候，检测细胞内和细胞表面的标志物是非常有用的。至于细胞表面抗原，未分化的人 ES 细胞表达 SSEA-3、SSEA-4、TRA-160 和 TRA-181，这些标志物随着细胞分化而下调［Draper et al.，2004a，b］。NTERA2 EC 细胞系也具有这种表达谱。同时表达的还有与碱性磷酸酶（抗体 TRA-2-54 所识别［Andrew et al.，1984］）相关的抗原决定簇，人 Thy-1 和

HLA-A，B，C（一类主要组织相容性复合抗原）。在由视黄酸、二甲基亚砜（DMSO）、hexam-ethylenebisacetamide（HMBA）诱导的分化中，生成的细胞表现出很不相同的分子标志谱［Draper et al.，2002］，还经常伴随着增加的 VIN-IS-56（GD3 和 GD2）、VIN-2PB-22（GD2）和 A2B5［Eisenbarth et al.，1979］（GT3）抗体免疫染色的增强，这些都是神经节苷脂。这种表达谱与 NTERA2 细胞分化的特点相似［Draper et al.，2002；Andrews et al.，1990］。国际干细胞组织现正着手在全球范围内分类收集到的 ES 细胞系数据，并希望为研究者提供一个资源［Andrews et al.，2005］。

在跟踪神经分化的许多表面标记抗原中，有几种主要的抗体如 A2B5［Eisenbarth et al.，1979；Fenderson et al.，1987］（GT3）、VIN-IS-56（GD3 和 GD2）和 VIN-2PB-22［Andrews et al.，1990］（GD2）可被用来识别神经节苷脂和用来分离可能的神经前体细胞。特别在 NTERA2 分化过程中，利用 A2B5 的表达与否可以获得一个含有高表达 NeuroD1 和 NSE 表达水平的一个细胞群体［Przyborski et al.，2000］。另一个表面标志 N-CAM 是细胞表面糖蛋白，据认为参与神经细胞之间的黏附［Rutishauser et al.，1982］，同时针对 N-CAM 的抗体也可提供一个有用的鉴定神经细胞谱系的工具。

其他细胞内标志，在纯化细胞群体的时候并不十分有用，但是在检测神经分化的过程中是非常重要的，如其中的一个标志物 VI 中间纤维蛋白 nestin，在神经发生［Lendahl et al.，1990］和成体神经上皮干细胞中表达［Hockfield et al.，1985］。它是利用 Rat-401 单抗首先在大鼠中发现的［Hockfield et al.，1985］，并且位于许多区域如室管膜下区［Doetsch et al.，1997］、海马齿状回［Yamaguchi et al.，2000］，甚至胰腺［Street et al.，2004］。它主要在神经上皮祖细胞中表达，并且也见于其他类型的细胞，如损伤后的星状细胞［Clarke et al.，1994］，在成熟的神经元和少突寡状细胞中表达降低［Gallo et al.，1995］。然而，nestin 不是鉴定神经祖细胞的理想标志物，这是因为它在未分化的 ES 细胞和 NTERA2 细胞中也有较高表达。

β-微管蛋白Ⅲ（β-Tubulin Ⅲ，也称为 β-6tubulin）是另一个细胞骨架蛋白，它只在较高等的脊椎动物的神经元中发现（除了一些胚胎结构的短暂表达），它是神经分化和轴突生长的标志分子［Schachner et al.，1981］（见综述，Katsetos et al.，2003］。TUJ1 单抗是识别这个分子的特异抗体，在免疫染色中它与其 C 端结合［Lee et al.，1990］。

对高度保守基因 *Musashi-1* 进行的一系列研究表明 β-Tubulin Ⅲ在细胞命运决定包括维持干细胞状态、分化和肿瘤发生过程中起着重要的作用［Okano et al.，2005］。它也作为人大脑神经干和祖细胞的一个分子标志［Okano et al.，2005］。目前，已经有了能识别 *Musashi-1*，但不是 Musash-1 相关蛋白 Musash-2 的大鼠单抗（Mab14H1 和 14B8）［Kanemura et al.，2001］。

使用小鼠 IgM 单克隆抗体 01～04 可以检测少突寡状细胞，这个抗体只识别少突寡状细胞谱系而不是神经元、胶质细胞和成纤维细胞［Sommer et al.，1981］。通常，01 和 02 仅发现和存在于半乳糖脑苷脂表达阳性的少突寡状细胞（通常在延长培养时间之后），而 03 和 04 既表达于半乳糖脑苷脂阳性也表达于阴性的少突寡状细胞，可根据这些抗原表达的不同来区别少突寡状细胞［Schachner et al.，1981］。小鼠脑桥培养的细

胞中，03 和 04 比 01 和 02 早出现一天，并且也能在新生小鼠小脑中表达，相反的，01 和 02 在小鼠出生后一周才出现 [Schachner et al.，1981]。这两组还表现出形态学的差异，如 01/02 表达的细胞大多数是"有睫毛的眼球"状的少突寡状细胞类型，而 03/04 表达的细胞表现出简单的形态学而且突触较少 [Schachner et al.，1981]。

3.2 其他方法

细胞凝集是诱导人类 EC 和 ES 细胞分化的一个常见方法。Martin 和 Evans [1975] 首先使用细胞凝集法诱导小鼠 EC 细胞分化。从那时起，细胞凝集法就成为不同 EC 细胞系（F9、P19 和 NTERA2）[Cheung et al.，1999] 和 ES 细胞 [Itskovitz-Eldor et al.，2000] 分化诱导方案中的一种。采用这种方式的长处是来自于增加的细胞间接触，促进细胞间信号传递，这是体内发育的一个重要方面。其他诱导 EC 和 ES 细胞分化的早期技术在含标准血清培养基中使用视黄酸（RA），但是这被后来的基于无 RA 的无血清培养基的较好的改进条件所替代。该无血清条件被证明是小鼠和人 ES 和 EC 细胞向神经诱导分化成功的方案 [Okabe et al.，1996；Zhang et al.，2001；Marchal-Victorion et al.，2003]。

最初利用无血清培养基和细胞凝集的条件以维持神经干细胞于"神经球"状态 [Carpenter et al.，1999]，这就有可能得到表现出放射状的胶质细胞形态特点的 NTERA2 细胞（含有 BLBP、Pax6 和 3CB2）[Marchal-Victorion et al.，2003]。使用这些条件极大地增加了 NTERA2 神经元数量，从 5%～30%。

试图高效诱导神经细胞分化产生了许多使用共培养未分化细胞和其他细胞系的方案 [Kawasaki et al.，2000；Saporta et al.，2004]，尽管这些细胞产生的神经因子目前尚不明确。显然，NTERA2 对 PA6 基质细胞系产生的分化因子的反应方式与人 ES 细胞非常相似，两者都产生能表达酪氨酸羟化酶的多巴胺神经元 [Schwartz et al.，2005]。因此，上述相同点表明，在再生医学的最终应用方面，简单的 NTERA2 系统可以作为 ES 细胞的很好补充。

通过使用条件培养基诱导细胞分化是不太理想的 [Schulz et al.，2004；Zeng et al.，2004]。为了使实验标准化，两种细胞系需要持续观察和保存。此外，如果条件培养基中的分化诱导因子未知时，方案的标准化也会尤为困难。

迄今，已有数种诱导人 ES 细胞向神经祖细胞分化的方法。如上所述，其中的一个方法包括多步骤诱导人 ES 细胞向神经球分化。神经球可以在补充有成纤维生长因子-2（FGF-2）的悬浮培养条件下培养，但是它们在去除 FGF-2 的情况下可被进一步地诱导分化成星型胶质细胞、神经元和少突寡状细胞 [Zhang et al.，2001]。

其他方法基于人和小鼠 ES 细胞的单层分化 [Conti et al.，2005；Shin et al.，2005]。其中有关小鼠的一项研究依赖于表皮生长因子（EGF）和 FGF-2 的联合应用以促进细胞的持续增殖，在去除生长因子时，出现分化现象 [Conti et al.，2005]。证据还表明，生成的神经干细胞（NS）与在胎儿发育期短暂存在的一种神经干细胞，即放射状胶质细胞，有密切关系。以前的研究提示，仅在 FGF-2 存在的条件下，所产生的培养物最终会导致不能描述为真正的神经干细胞的胶质局限性的细胞系出现 [Li et

al.，2001]。

在人 ES 细胞神经分化过程中使用的其他单层培养技术，包括使用骨形态蛋白(BMP) 抑制子 Noggin [Gerrard et al.，2005]。目前的几项研究表明人 ES 细胞培养条件下加入 Noggin 能导致成熟神经和胶质细胞谱系的生成 [Pera et al.，2004]，以及神经祖细胞的生成 [Gerrard et al.，2005]。使用的方法涉及在经过 EDTA 处理以及补充有 Noggin 的特殊神经培养基培养之前，将人 ES 细胞种植于条件培养基 Matregel 上。在重新种植单细胞之前，神经前体细胞能传几代并能在增加或去除某些生长因子的情况下诱导分化。

总之，人 ES 细胞具有诸如多潜能性、自我更新方面的许多特征，因此非常适用于研究和最终的临床应用。尽管调控自我更新和分化程序的细胞机制还远远不清楚，但是已有大量的关于 EC 细胞、鼠 ES 细胞和其他组织的干、祖细胞的信息可作为研究的基础。通过使用这些信息并进一步的研究分化成神经和其他组织的分化过程，我们便能探索干细胞的组织发育和细胞定向成为某些细胞谱系的潜能。

3.3 方法的原理和优势

ES 和 EC 细胞分化的研究都促进了实验技术的发展。ES 细胞对分化诱导和细胞死亡非常敏感，因此建立实验方法是一个漫长而艰辛的过程。EC 细胞显著特点和它们类似于 ES 细胞的未分化性质，使得它们在 ES 实验之前成为建立实验技术理想的细胞系。我们发现这在建立诸如 RNAi 技术方面尤为如此 [Matin et al.，2004]。

视黄酸（RA）是诱导 EC 细胞分化的经典物质 [Strickland and Mahdavi 1978]。RA 的暴露能诱导 NTERA2 人 EC 细胞分化，典型表现为干细胞标志（Oct4、SSEA3、TRA-1-60）的缺失，以及典型的神经分子标志如 neuroD、β-Ⅲ微管蛋白（tubulin）和神经丝（neurofilaments）的上行调节 [Pleasure et al.，1992；Fenderson et al.，1987；Przyborski et al.，2000；Andrews et al.，1984，1987]。RA 导致的 NTERA2 细胞神经方向的分化是非常可预见性的并且可持续的，能为 ES 细胞神经方向分化提供阳性对照。

在有丝分裂抑制子存在的情况下，经过连续 4 周 RA 的处理和连续传代，分离一种单纯的神经元群体是可能的 [Leypoldt et al.，2001]。这些 NTERA2 细胞来源的神经元经过了广泛的分析，显示出它们在功能上是成熟的，一定程度上能表达一系列神经传递因子的表型（catecholinergic、cholinergic、GABAergic 和 serotonergic） [Squires et al.，1996；Guillemain et al.，2000]，并且能形成功能性的突触 [Hautley et al.，1999]。通过应用可靠的 NTERA2 细胞的神经分化，有可能建立并完善新的技术。

3.4 培养基和试剂的准备

3.4.1 培养基

3.4.1.1 DMEM/10FB 和 DMEM/20FB

DMEM/10FB，DMEM，4.5g/L 葡萄糖，含 10%胎牛血清。

DMEM/20FB：DMEM，4.5g/L 葡萄糖，含 20%胎牛血清。

3.4.1.2　人胚胎干细胞（hES）培养基（约 500ml）

Knockout DMEM	400ml
Knockout 血清替代品	100ml
FGF-2	4ng/ml
非必需氨基酸，100×	5ml
β-巯基乙醇	3.5μl
L-谷氨酰胺	1.0mmol/L

3.4.1.3　神经球增殖培养基（100ml）

DMEM/F12	99ml
N2 补充物	1 ml
FGF-2	20 ng/ml
胰岛素	20μg/ml
肝素硫酸钠盐	2μg/ml

3.4.1.4　神经球培养基（100ml）

DMEM/F12	97ml
B27 补充物	2ml
胰岛素-转铁蛋白-硒补充物	1ml
FGF-2	20ng/ml

3.4.1.5　EC 细胞分化培养基

DMEM/10FB（见 3.4.1.1 节），补充 10mmol/L 全反式视黄酸（ATRA）。

全反式视黄酸是光敏感性的。应在暗光下操作。溶于 DMSO，10mmol/L 贮存液存放于－20℃，临用前 1∶1000 稀释。

3.4.1.6　EB 培养基（约 500ml）

Knockout DMEM	400ml
Knockout 血清替代品	100ml
非必需氨基酸，100×	5ml
β-巯基乙醇	3.5μl
L-谷氨酰胺	1.0mmol/L

3.4.2　酶

3.4.2.1　胶原酶

胶原酶Ⅳ，10mg，溶于 10ml DMEM/F12，终浓度为 1mg/ml，过滤除菌。

3.4.2.2 中性蛋白酶

用无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 磷酸盐缓冲液（PBSA），按 1∶4000 稀释中性蛋白酶贮存液。

3.4.2.3 胰蛋白酶/EDTA

胰蛋白酶，0.05%（*W/V*），EDTA，0.5mmol/L，溶于 PBSA。

3.4.3 基质

3.4.3.1 琼脂糖

琼脂糖，1%（*W/V*），溶于 DMEM/F12（见 3.4.1.1 节）。

3.4.3.2 明胶层

明胶，0.1%（*W/V*），溶于 PBSA。
将明胶溶液加入到培养瓶或培养皿中，放置 5～10min，除去，使培养瓶/皿干燥。

3.4.4 其他试剂

3.4.4.1 流式细胞计数冲洗缓冲液

(a) 胎牛血清，U.S. 原产，用 PBSA 配制成 5%。
(b) 胎牛血清，U.S. 原产，用 PBSA 和 0.1%（*V/V*）Triton X-100 配制成 5%。

3.4.4.2 多聚甲醛，4%（*W/V*）

4g 多聚甲醛溶于 100ml PBSA，搅拌并加热直至完全溶解；4℃存放。

3.4.4.3 Triton 溶液

用 PBSA 配制成 0.1%（*V/V*）Triton X-100 和 5%胎牛血清。

3.4.4.4 含山羊血清的 Triton X-100 缓冲液

PBSA 中含有 1%（*V/V*）Triton X-100，1mol/L 甘氨酸，5%正常山羊血清。

3.4.4.5 阻断溶液

PBSA 中含 5% FBS，0.1%（*V/V*）Triton X-100。

3.5 细胞培养

注意：没有其他提示的情况下，所有操作程序均在无菌条件下Ⅱ级层式通风橱中进行。

3.5.1　人ES细胞系的维持

有关人ES细胞传代培养的详细资料请参阅第2章。

3.5.2　NTERA2细胞系的维持

NTERA2细胞生长于含10%胎牛血清的高葡萄糖DMEM培养基中，并且每个$25cm^2$或$75cm^2$细胞培养瓶置10% CO_2，37℃恒温培养箱中。当细胞达到汇合，常规的细胞传代采用机械脱离法。基于细胞增殖和细胞密度，汇合的NTERA2细胞按1∶3的比例每3天进行分瓶。

方案3.1　NTERA2细胞的传代培养

试剂和材料

灭菌

☐ DMEM/10FB（见3.4.1.1节）

☐ 玻璃珠，3mm

☐ 培养瓶，$25cm^2$或$75cm^2$

步骤

(a) 吸出生长培养液，保留少量体积（约2ml）。

(b) 将灭菌的3mm玻璃珠放入培养瓶中，并轻轻地从一边向另一边摇动，使之覆盖全部细胞生长面，以分散细胞。

(c) 加5ml培养液悬浮分散的细胞，并分装到3个新培养瓶中。

细胞传代的数量按P55的限定，以使细胞的基因型或表现型改变降到极少。

3.6　冻存

3.6.1　NTERA2

方案3.2　NTERA2细胞的冻存与复苏

试剂和材料

灭菌

☐ DMEM/10FB（见3.4.1.1节）

☐ 冻存液：90% FBS，10% DMSO（V/V）

☐ 玻璃珠，3mm

步骤

(a) 用玻璃珠机械分散细胞培养物，并用 DMEM/10FB 重悬细胞（见方案 3.1）。

(b) 将悬浮细胞放入一个灭菌管中，4℃，12000r/min（277g）离心 3min。

(c) 吸出培养液，用冻存液重悬细胞团。

(d) 将细胞悬液等分到 1ml 冻存管中。

(e) 将冻存管放置到一个 Nalgene 冷冻盒中，并于−80℃放置至少 24h。

(f) 当冻存管达到−80℃时，转移至液氮储存。

(g) 从液氮中取出冻存物，37℃迅速融解。

(h) 用 10ml DMEM/10FB 洗涤细胞，以去除残留的 DMSO，1200r/min（277g），离心 3min。

(i) 用 5ml 新鲜培养液重悬细胞，接种到 25cm^2 培养瓶中。

3.6.2 人 ES 细胞的冻存与复苏

采用普通方法从 25cm^2 培养瓶中收获汇合的细胞（见第 2 章）。并且用 10ml 培养液将细胞转移至 15ml 管中，然后，依照 NTERA2 细胞冻存步骤进行，只是离心条件改为 4℃，800r/min（123g）离心 3min。融解温度相同。详细资料见第 2 章的人 ES 细胞的冻存与融解。

3.7 分化

3.7.1 ES 细胞

方案 3.3 视黄酸诱导的人 EC 细胞分化

试剂和材料

消毒或无菌制备

☐ NTERA2 细胞汇合培养物

☐ DMEM/10FB

☐ ATRA，10mmol/L 溶于 DMSO；−20℃贮存

☐ 分化培养液：DMEM/10FB，添加 10mmol/L ATRA（见 3.4.1.5 节）

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 3.4.2.3 节）

☐ 培养瓶，75cm^2

步骤

(a) 用 2ml 胰蛋白酶-EDTA 消化液于 37℃孵育，直至细胞从培养瓶底面分散

下来。

(b) 另加 8ml DMEM/10FB，以灭活胰蛋白酶活性。

(c) 1200r/min (277*g*) 离心 3min。

(d) 用分化培养液按每 $75cm^2$ 培养瓶接种细胞 $1×10^6$ 个。

(e) 每 7 天更换分化培养液。

细胞在 2～3 天内开始分化，7 天后细胞呈现出十分特殊的形态学改变和表面抗原的表现型；第 2 周之内开始出现神经元。

3.7.2　ES 细胞

方案 3.4　胚胎样体 (EBs) 内的人 ES 细胞分化

试剂和材料

灭菌

- ☐ DMEM/10FB (见 3.4.1.1 节)
- ☐ EB 培养液：无 FGF-2 的人 ES 细胞培养液 (见 3.4.1.6 节)
- ☐ 胶原酶Ⅳ溶液，1mg/ml (见节 3.4.2.1)
- ☐ 玻璃珠，3mm
- ☐ 培养皿，细菌学级，10cm ($78.5\ cm^2$)
- ☐ 离心管，15ml
- ☐ 涂有明胶的培养瓶或皿 (见 3.4.3.2 节)

步骤

(a) $25cm^2$ 组织培养瓶中汇合生长的人 ES 细胞。

(b) 从培养瓶中吸去培养液，加入 1ml 胶原酶，确保胶原酶覆盖全部细胞的生长面，然后移入 37℃，5% CO_2 温箱，作用 15min。

(c) 从温箱中取出培养瓶，检查确定细胞集落边缘卷缩，然后加入大约 20 粒玻璃珠到培养瓶内。

(d) 从一边到另一边轻轻摇动培养瓶，使细胞从瓶壁脱落下来。

(e) 加入 9ml DMEM/10FB，并研磨 5～10 次重悬细胞。

(f) 从培养瓶中吸出细胞悬液，置入 15ml 无菌管中。

(g) 4℃，800r/min (123*g*) 离心 3min。

(h) 10ml EB 培养液重悬细胞团块，将悬液移入一个 3.5cm 细菌培养皿中。该步骤是有必要的，采用细菌培养皿可防止 EB 细胞附着在平皿的底部。

(i) 将平皿放置于 37℃，5% CO_2 温箱中。

(j) 继续培养悬浮细胞，每 2 天更换新鲜 EB 培养液。

　i) 将细胞和培养液转移至 15ml 管内。

ii）使 EBs 自然沉降 10min。

iii）吸去上层培养液，用 10ml 新鲜培养液重悬细胞。

iv）然后将 EBs 转入平皿内。

（k）21 天悬浮培养之后，此时 EBs 应充分分化。21 天之前便可见到自发分化，但人 EBs 细胞也许更早就已经存在。对于贴附和 EBs 最初分化细胞生长来说，明胶是一种有效的基质。

i）如更换培养液一样，将 EBs 从平皿中移出。

ii）用 EB 培养液将 EBs 细胞重新接种到覆盖有明胶的培养瓶/皿中。接种密度依据 EBs 大小（不同的正常培养范围），但是通常情况下每 $25cm^2$ 约有 50 个 EBs 已足够。

iii）自发分化可见于 EBs 接种后重新贴附的生长细胞。

3.7.3 神经球

方案 3.5 来源于人 ES 细胞的神经球的诱导

（按 Zhang et al. [2001]）

试剂和材料

灭菌

☐ DMEM/10FB（见 3.4.1.1 节）

☐ EB 培养液（见 3.4.1.6 节）

☐ 神经球膨胀培养液（见 3.4.1.3 节）

☐ 胶原酶Ⅳ溶液（见 3.4.2.1 节）

☐ 中性蛋白酶，0.1mg/ml（见 3.4.2.2 节）

☐ 玻璃珠，3mm

☐ 培养瓶，$25cm^2$

☐ 培养瓶，$25cm^2$，明胶包被（见 3.4.3.2 节）

☐ 离心管，15ml

非灭菌

☐ 琼脂糖

步骤

1 期（0 天）

（a）在 $25cm^2$ 培养瓶中培养人 ES 细胞直至汇合（见第 2 章，2.5 节）。

（b）从瓶中吸出培养液，加入 1ml 胶原酶Ⅳ溶液，确保胶原酶覆盖全部细胞的生长区。

(c) 将培养瓶放置于37℃，5% CO_2 温箱15min。

(d) 从温箱中取出培养瓶，检查确定细胞集落边缘卷缩。

(e) 将约20个灭菌玻璃珠加入到瓶内，然后从一边到另一边轻轻晃动，使细胞从瓶底表面脱落。

(f) 在瓶中加9ml DMEM/10FB培养液，反复晃动5～10次，重悬细胞。

(g) 从瓶中吸出细胞悬液，加入到15ml灭菌管中，4℃，800r/min（123*g*）离心3min。

(h) 吸去上清，加5ml EB培养液，重悬细胞团块。

(i) 将悬液转移至无明胶覆盖的25cm^2培养瓶中，于37℃，5% CO_2 温箱中孵育4天。

(j) 每日更换培养液，就是将漂浮的细胞团块和培养液移至到一只15ml灭菌管中。

(k) 使细胞团块（EBS）自然沉降15min。

(l) 吸去旧培养液，添加新鲜培养液。

(m) 重新将细胞悬液移至细胞培养瓶内，并置于温箱。

2期（4天）

(a) 悬浮培养4天之后，将胚胎样体移至15ml管内，自然沉降15min。

(b) 吸去旧培养液，加5ml神经球扩增培养液。

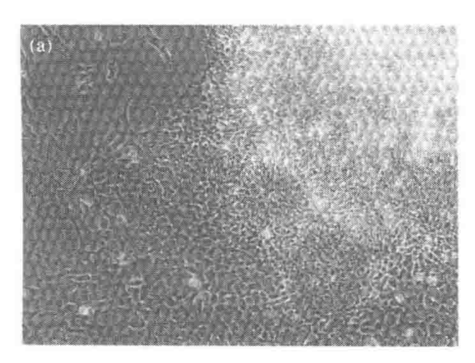
(c) 在每个明胶覆盖的25cm^2培养瓶中接种约50个EBs，并且使每瓶的神经球扩增培养液总体积达10ml。

(d) 将培养瓶放置于37℃，5% CO_2 温箱中孵育4天。

(e) 每2天换液，即吸去旧培养液，加入10ml新鲜的神经球扩增培养液。

3期（14天）

(a) 2期的10天之后，相差显微镜下检查每瓶中出现的神经元玫瑰花球（图3.1）。



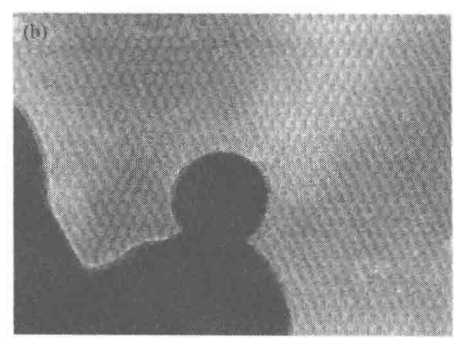


图3.1 单层的神经元玫瑰花球（a）和悬液中的神经元球（b）

(b) 从每瓶中吸去上清，再加入1ml 0.1mg/ml的中性蛋白酶，使中性蛋白酶覆盖住细胞层，然后将培养瓶放置在37℃，5% CO_2 温箱孵育15min。

(c) 从温箱中取出培养瓶并自一边向另一边轻轻摇动，使神经元玫瑰花球解离。

(d) 轻轻地于每瓶加9ml DMEM/F12，稀释中性蛋白酶，然后将10ml（总体积）的神经元玫瑰花球培养物移至一15ml管内。

(e) 4℃，800r/min（123*g*）离心3min，吸去上清，加5ml神经球扩增培养液重悬细胞团块。

琼脂糖包被

(a) 琼脂糖包被是一种节省成本的，有效防止细胞培养瓶内的悬浮培养物产生不必要贴附的方法（比较别的方法）。细胞孵育过程中，用 DMEM/F12 制备 1%（*W*/*V*）的琼脂糖，并于微波炉以最大功率加热 30～40s 直至溶解。

(b) 室温冷却不超过 10min，然后用琼脂糖涂布细胞培养瓶的底面。很重要的一点是：琼脂糖足够热而没有开始凝固，如果太热，就导致培养瓶的塑料发生卷曲。

(c) 室温静置 20～30min。

(d) 在每个有琼脂糖涂层的培养瓶中加 5ml 含有神经元玫瑰花结的神经球培养液。

(e) 放置到 37℃，5% CO_2 温箱中。

方案 3.6　神经球培养物的维持

试剂和材料

灭菌

- ☐ 神经球扩增培养液（见 3.4.1.3 节）
- ☐ 25cm^2，琼脂糖包被的培养瓶，(见方案 3.5，琼脂糖包被)
- ☐ 离心管，15ml

步骤

饲养

(a) 每 3～5 天更换一次新鲜的神经球培养液（依据神经球的大小）：

i) 将神经球悬浮物转移至 15ml 管内，使球体自然沉降 10～20min。

ii) 吸去旧培养液，加入 10ml 新鲜的神经球培养液。

iii) 将神经球培养物移回到有琼脂糖涂层的培养瓶中，然后将瓶放回到 37℃，5% CO_2 温箱中。

(b) 时间过长，神经球将会聚集成一个大团块，导致接种和传代困难。因此，当培养或传代时，在搅拌台上彻底分散任何细胞团块是很必要的。

神经球培养物的传代

神经球的传代每 2～3 周进行一次，或当它们的大小一定时就进行传代。培养时间过长，它们趋向聚集，并且在同一培养瓶内不要有太多的球体是很重要的。

i) 从培养瓶中取出球体，让其自然沉降，如同常规培养一样，用 10ml 新鲜神经球培养液取代旧培养液。

ii) 为每一个要进行传代的培养瓶准备 2 个新的琼脂糖覆盖的培养瓶。

iii) 用新鲜培养液将一只离心管中的神经球转移到 2 个 25cm^2 培养瓶中，并补足培养液至总体积 10ml。

iv) 37℃，5% CO_2 温箱孵育。

方案 3.7　神经球分化的再接种

试剂和材料

灭菌

- □ 神经球培养物或琼脂糖包被的培养瓶
- □ 神经球培养液（见 3.4.1.4 节）
- □ 胰蛋白酶，0.05%（W/V），0.5mmol/L EDTA
- □ 明胶包被的 $25cm^2$ 培养瓶（见 3.4.3.2 节）

步骤

再接种（replating）

（a）根据神经球的大小和要接种容器的大小，从琼脂糖包被的 $25cm^2$ 培养瓶中取出所需数量的神经球。例如，直径约 1mm 的 20 个神经球适合于一个 $25cm^2$ 培养瓶。

（b）明胶包被的 $25cm^2$ 培养瓶接种神经球，并使之贴附和生长 3～4 天，每隔一天更换新鲜的神经球培养液。此时，当从球中分散出单个细胞，再定驻下来，开始增殖，便可观察到明显的神经元分化，并表现出一系列的形态学改变（图 3.2；彩图 1）。

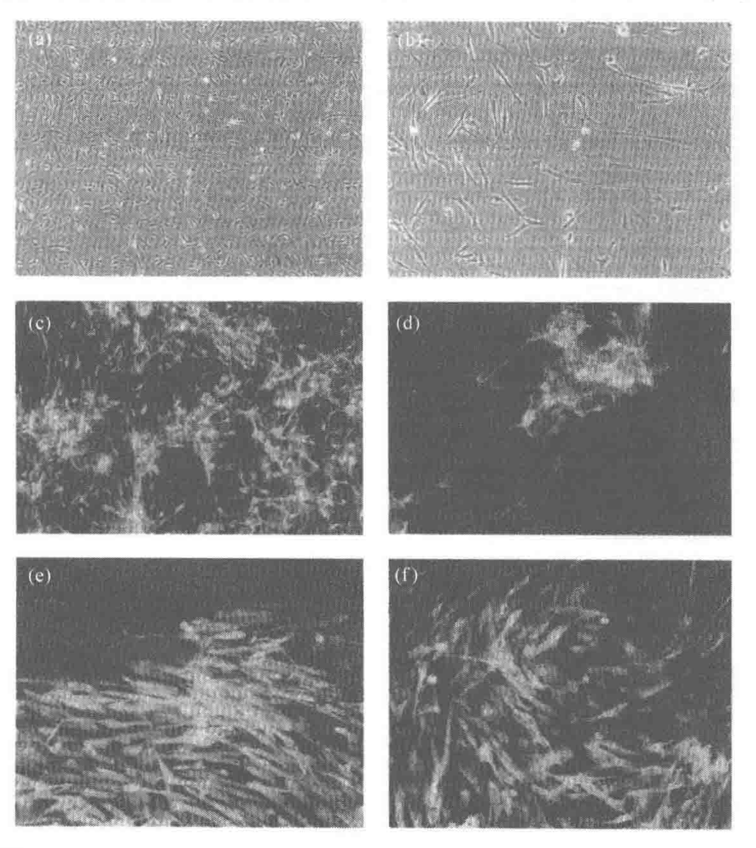


图 3.2　HUES-1 NS 细胞，相差 4×(a)；相差 10×(b)；TUJ1 再接种 (c)；nestin (d)；3 代后的 TUJ-1 (e)；nestin (f)；(见彩图 1)

再接种的神经球传代

(a) 3～4 天后，当神经突起生长过快并盖过了瓶底区域，吸出培养液，加 1ml 胰蛋白酶/EDTA 作用 5min。

(b) 5min 之后，可见大部分细胞漂浮于上清中。再加入 9ml DMEM/10FB，晃动上清数次，使得细胞从瓶底脱落下来，并进一步分散细胞的小团块。

(c) 将悬液移至 15ml 管内，4℃，800r/min（123*g*）离心 3min。

(d) 去掉上清，加 9ml 神经球培养液重悬细胞团。

(e) 取 3ml 细胞悬液加入到 3 个明胶包被的培养瓶中（1∶3），然后在每瓶中补加培养液至总体积 10ml。

(f) 将培养瓶放置 37℃，5% CO_2 温箱孵育。

(g) 传了 3 代左右，神经球的残留物还将存在于培养瓶中。这可通过连续传代逐步消除，直至长成单层细胞。

再接种神经球（NS 细胞）的维持

几次传代之后，神经球（NS）来源的细胞在培养液中显示出优势。尽管按它们的形态还不能就认定是神经元，但它们具有了早期神经细胞的饿形态标志，如 musashi-1 和 nestin（见图 3.2）。

(a) 每隔一天，吸出旧培养液，加 10ml 新鲜培养液。

(b) 每 3～4 天，用 0.05%胰蛋白酶和 0.5mmol/L EDTA 消化液作用 5min，消化传代，这与神经球再接种的方法相同。对于 NS 细胞，1∶3 比例分瓶即可。

3.8 分析

3.8.1 间接免疫荧光

3.8.1.1 细胞内抗原

方案 3.8 细胞内抗原的抗体染色

试剂和材料

非灭菌

□ PBSA

□ 多聚甲醛（见 3.4.4.2 节）

□ 阻断剂：1%（*V/V*）羊血清和 PBSA 配制的 Triton X-100 0.1%（*V/V*）

□ 阻断剂中的一抗

□ 阻断剂中的二抗

步骤

(a) 用 PBSA 轻轻地清洗细胞。
(b) 室温下，与 4%多聚甲醛混匀，放置 20min。
(c) PBSA 再次清洗细胞，然后与阻断剂孵育 10min。
(d) 吸去阻断剂，加入含相关一抗的阻断剂，其适当的稀释度由滴定确定。
(e) 室温孵育 1h 或过夜。
(f) 一抗孵育之后，用 PBSA 洗细胞 3 次。
(g) 加入含有相关二抗的阻断剂，室温孵育 1h。
(h) 用 Hoechst33342 (10μg/ml) 染细胞核 5min。
(i) PBSA 洗涤并保存在 PBSA 中待观察。

3.8.1.2　溴脱氧尿苷 (BrdU) 染色

鉴定和检测细胞分化途径的一个重要方面是要确定特殊的细胞类型。判断是属于有丝分裂期后的还是仍保持增殖，通过掺入胸腺嘧啶脱氧核苷的类似物 (BrdU)，可以准确评价细胞是否进行增殖，即细胞是否继续进行 DNA 复制。运用方案 3.9，可评价 BrdU掺入的再掺入，并同时采用蛋白表达的荧光染色法（图 3.3；彩图 2）。BrdU 作用时间的长度限定了如何解释结果：BrdU 短暂作用 1h，能够使特殊表型的细胞增殖（标记指数），而作用时间较长 (24h)，可估计活跃分裂的细胞数量（生长分数）。

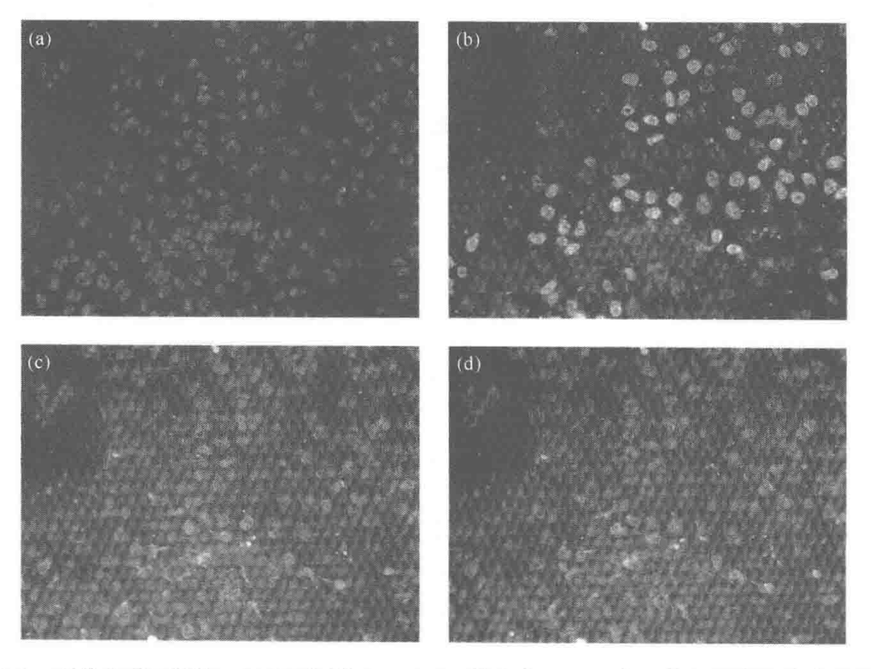


图 3.3　未分化 EC 细胞。BrdU 作用 1h，BrdU 掺入和 nestin 表达的经固定和染色的细胞
(a) 蓝色，Hoechst 33342；(b) 绿色，BrdU；(c) 红色，Nestin；(d) 三种颜色重叠（见彩图 2）。

方案 3.9　分化神经元细胞的标记指数和生长分数的确定

试剂和材料

灭菌

- ☐ 神经球或再接种神经球生长培养物
- ☐ PBSA
- ☐ BrdU，10mmol/L，溶于适当的生长培养液

非灭菌

- ☐ HCl，1mol/L 和 2mol/L
- ☐ PBSA Triton X-100：PBSA 中含 0.1%（*V/V*）的 Triton X-100
- ☐ 硼酸盐缓冲液，0.1mol/L
- ☐ 含 Triton X-100，甘氨酸和正常山羊血清的 PBSA（见 3.4.4.4 节）
- ☐ 抗-BrdU 抗体
- ☐ Hoechst33342，10μg/ml，PBS 配制

步骤

(a) 去掉生长培养基，加入含 BrdU 的培养液。
(b) 按所需时间进行孵育（标记指数实验需 1h，生长分数实验需 24h）。
(c) PBSA 洗涤细胞。
(d) 4%多聚甲醛 4℃固定细胞 30min。
(e) 用含 1% Triton X-100 的 PBSA 洗涤细胞 3 次，每次 5min。
(f) 1mol/L HCl，冰上孵育细胞 10min，以打开标记细胞的 DNA 结构。
(g) 室温，2mol/L HCl 作用 10min。
(h) 37℃孵育 20min。
(i) 加入硼酸盐缓冲液中和酸性物质。
(j) 室温孵育细胞 12min。
(k) 室温下用 PBSA/Triton X-100 洗涤样品 3 次，每次 5min。
(l) 用含 Triton X-100、甘氨酸和山羊血清的 PBSA 孵育 30min。
(m) 4℃下，用抗-BrdU 的抗体或抗-BrdU 和其他抗体的化合物孵育细胞过夜(Nestin 或 TUJ1)。
(n) PBSA/ Triton X-100 洗涤细胞 3 次，每次 5min。
(o) 细胞标本可用一系列的二级抗体作用来显示抗-BrdU 标记的细胞。
(p) 含 Hoechst33342 10μg/ml 的 PBSA 孵育细胞 5min。
(q) PBSA 洗涤并贮存细胞，以备流式细胞仪进行分析。

3.8.2　流式细胞术

3.8.2.1　细胞表面抗原

经间接免疫荧光染色的未固定的单细胞悬液可用流式细胞仪进行分析。

方案 3.10　神经元细胞表面抗原的流式细胞术分析

试剂和材料

灭菌

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 3.4.2.3 节）

非灭菌

☐ 一抗，二抗
☐ 流式细胞术洗涤缓冲液（见 3.4.4.1a）
☐ FACS 缓冲液
☐ FACS 管

步骤

（a）1ml 胰蛋白酶/EDTA 作用细胞约 2min，以获得单细胞悬液。

（b）在细胞悬液中加入 9ml 洗涤缓冲液并轻轻晃动，直至全部小团块分散成单个细胞。

（c）血球计数板确定细胞浓度。

（d）4℃，1200r/min（277g）离心 3min。

（e）吸去上清，用流式细胞术洗涤缓冲液重悬细胞，并使细胞浓度达到 5×10^6 个/ml。

（f）96 孔板，每孔加 50μl 细胞悬液。

（g）将抗体稀释成相应的工作液体积（用流式细胞术洗涤液稀释），并且在含有细胞的孔中加入 50μl。作为阴性对照，可选择不加一抗或用亲本骨髓瘤细胞系 P3X63Ag8 产生的非特异性抗体替代。或许，某些人可能认为使用不与细胞结合的同类抗体是必要的。

（h）用封口机密封平板，并将之放到摇床上 4℃摇动 1h。

（i）初次孵育之后，4℃，1200r/min（277g）离心平板 3min。

（j）去掉封口膜，吸去含抗体的溶液，留下细胞团。

（k）用 100μl 洗涤液洗细胞，共 3 次。

（l）稀释二抗，并在每孔中加入 50μl，然后将平板放回到摇床上，4℃摇动 1h。

（m）孵育后，离心，并洗涤细胞 3 次，然后在 FACS 管内，用 500μl FACS 缓冲液重悬细胞。

（n）流式细胞术分析。省略非单个细胞、前散射光的细胞碎片和倒散射光的死亡细胞。每份样品分析至少 1000 个细胞。

3.8.2.2　胞内抗原

除去细胞固定和渗透的要求外，用流式细胞术检测胞内抗原如 Sox2 的方法与分析细胞表面抗原的方法非常相似。

方案 3.11　用流式细胞术分析神经元细胞的胞内抗原

试剂和材料

灭菌

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 3.4.2.3 节）

☐ PBSA

非灭菌

☐ 多聚甲醛，4%（*W/V*）（见 3.4.4.2 节）

☐ 阻断液（见 3.4.4.5 节）

☐ 流式细胞术洗涤液（见 3.4.4.1b 节）

步骤

(a) 胰蛋白酶消化细胞，重悬，用 4%多聚甲醛室温固定 20min。

(b) PBSA 洗涤细胞二次，1200r/min（277*g*）离心 3min，收集细胞。

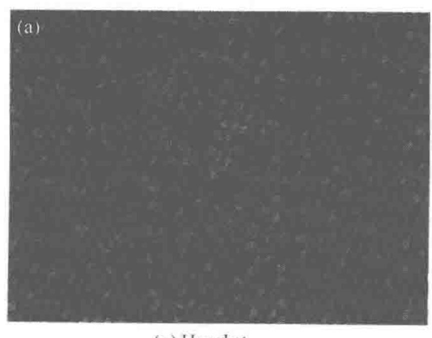
(c) 用阻断液充分重悬细胞，使之浓度为 5×10^5 个/ml，室温孵育 10min。

(d) 在 50μl 细胞悬液中加入适当稀释度的抗体 50μl，使总体积为 100μl 的悬液。

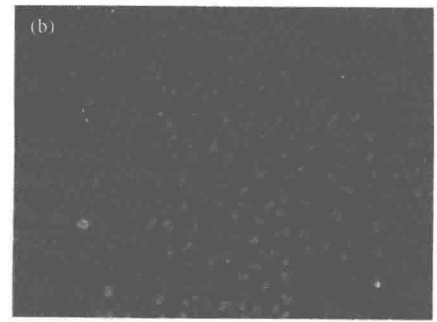
(e) 4℃，放置 1h。

(f) 细胞洗涤并二抗染色，与方案 3.10 中 (i)～(n) 步骤完全相同。除去二抗染液中含有的 Triton X-100（0.1%，*V/V*）之外（见 3.4.4.1b 节）。

(g) 在荧光显微镜下可见染色的细胞（图 3.4；彩图 3）。



(a) Hoechst



(b) Sox2

图 3.4　未分化的 NTERA2 细胞，着色细胞有 Sox2 表达（见彩图 3）

3.8.2.3　荧光激活的细胞分类

基于细胞表面抗原表达（NCAM，A2B5 等），通过荧光激活的细胞分类（FACS）可获得纯化的细胞类型。我们发现 FACS 对于分化之前的未分化细胞的纯化，以及分化细胞群体的纯化都具有价值。一旦获得活的分类细胞，那么就可以进行 PCR 分析或 Western 杂交，或维持活细胞留待日后的进一步分析。

方案 3.12　神经元细胞的荧光激活分类

试剂和材料

灭菌
- ☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 3.4.2.3 节）
- ☐ 一级和二级抗体
- ☐ DMEM/10FB（见 3.4.2.3 节）
- ☐ DMEM/20FB：DMEM，20%FBS
- ☐ 庆大霉素，50mg/ml（贮存液）
- ☐ FACS 缓冲液（含 10%FBS 的 PBSA）
- ☐ FACS 管，5ml，75×12mm

步骤

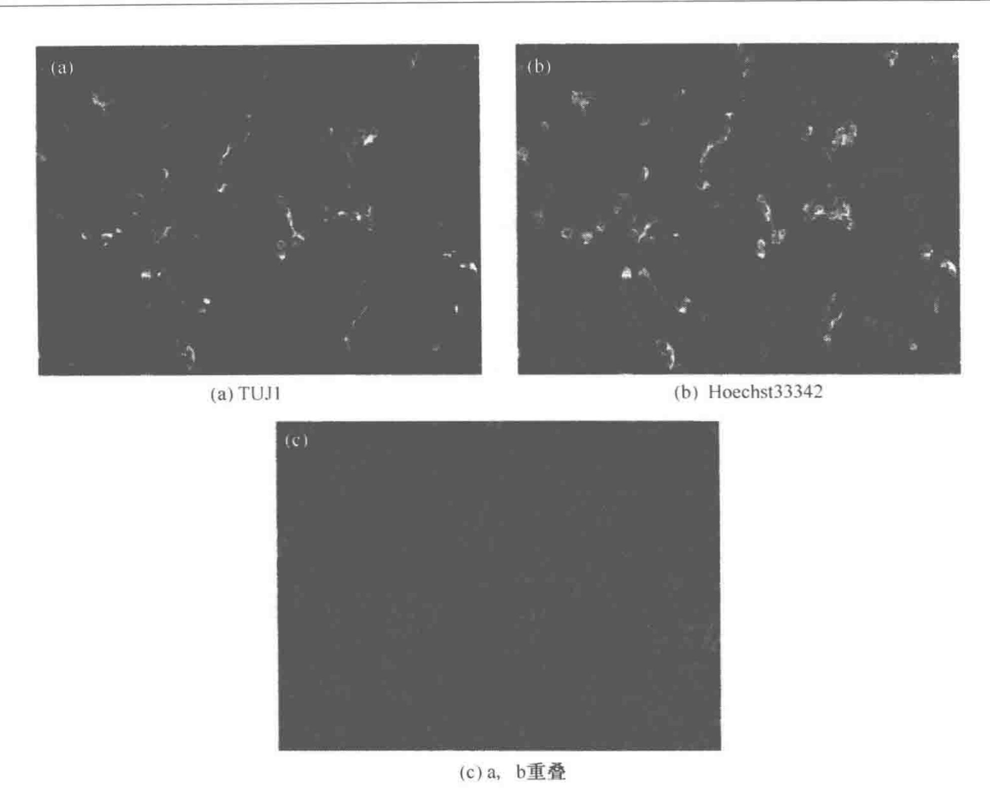
(a) 胰蛋白酶消化细胞成单细胞悬液。

(b) 除去使用正常生长培养液稀释的抗体和洗涤细胞之外，按流式细胞术分析法（见方案 3.10）中描述，用一抗和二抗进行细胞染色，按比例提高细胞数量和抗体的体积。

(c) 抗体染色后，用合适的流式细胞光度计分析细胞并分类。

(d) 用含 20%胎牛血清的补充培养液收集已分类的细胞。一旦收集细胞后，就要用于分子分析或在荧光显微镜下见到荧光时，将细胞接种到含抗体（庆大霉素 50μg/ml）的正常生长培养液中（图 3.5；彩图 4）。在 FACS 期间，依据细胞类型使用培养液。NTERA2 细胞可在含血清的培养液中处理，而人 ES 细胞则在其常规生长培养液中处理。

我们发现进行细胞分类非常有用，特别是对于评价细胞表面标记的表达与神经元通路的其他标记的相关性尤是如此（表 3.1）。因此，应用 PCR 分析 FACS 分类细胞的方法，可以将某种细胞表面抗原的有无，与多重转录因子的表达相关。



(a) TUJ1　(b) Hoechst33342

(c) a，b重叠

图 3.5　RA 作用 18 天后，经 FACS 纯化过的 A2B5 阳性 NTERA2 细胞。细胞再接种并 48h 之后染色标记（见彩图 4）

表 3.1　抗体使用

抗体	供应商	使用的技术
Sox2	BD Bioscience	Western，流式细胞术和免疫组织化学
Nestin	Abcam	流式细胞术和免疫组织化学
TUJ1（βIII-tubulin）	Covance	免疫组织化学和 Western
MAP2	Sigma	免疫组织化学
NF-68	Sigma	免疫组织化学和 Western
N-CAM（CD56）	Dakocytomation	流式细胞术和免疫组织化学
A2B5	Chemicon，ATCC	流式细胞术和免疫组织化学
Musashi-1	Abcam	免疫组织化学
GFAP	Dakocytomation	流式细胞术和免疫组织化学
O4	R&D Systems	流式细胞术和免疫组织化学
SSEA1	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
SSEA3	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
SSEA4	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
TRA-1-60	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
TRA-1-81	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
TRA-1-85	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
VIN-IS-56	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
P3X	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学
	Chemicon，Santa Cruz，DSHB	流式细胞术和免疫组织化学

3.8.2.4　神经元计数

EC和ES细胞在高密度生长时呈现典型的分化状态，这很难用肉眼计数神经元的数量。因而，为了容易计数神经元，我们在进行免疫荧光染色之前以较低的密度接种细胞。

方案3.13　计数培养的神经元

试剂和材料

灭菌

□ DMEM/10FB
□ 胰蛋白酶/EDTA（见3.4.2.3节）
□ TUJ1抗体
□ 多孔培养板，12孔（$3cm^2$/孔）

非灭菌

□ 多聚甲醛，4%（W/V）
□ Hoechst33342 DNA染料，50ng/ml

步骤

(a) NTERA2细胞经视黄酸诱导（见方案3.3）作用21天之后，胰蛋白酶消化，并用DMEM/10FB重悬细胞。

(b) 以1×10^5细胞/cm^2的密度将细胞接种到12孔培养板中，并孵育48h，使细胞贴附并易于轴突生成。

(c) 室温下，4%多聚甲醛固定细胞20min。

(d) TUJ1进行染色（见方案3.11）。

(e) TUJ1一旦着色，用Hoechst 33342进行复染，计数细胞核的数量即为细胞的总量。

(f) 通过对TUJ1的反应性识别神经元。识别神经元基于其形态学特点（胞体小，至少有一条突起）。

对于总细胞数和神经元计数，至少选择5个单独视野，有500个以上的细胞。

3.9　高通量筛选

由于NTERA2细胞易于培养，以及产生出能预知神经元百分率的可靠性，使得该细胞系成为以高通量系统研究细胞分化的理想细胞。长期以来，医药公司已经利用高通量技术筛选化合物库鉴定潜在的药物。现在，它也愈来愈适宜基础实验室使用这些自动

化技术［Abraham et al.，2004；Fennell et al.，2006］。

自动化系统和使用96孔板的优势在于容易探索多种细胞培养参数（底物黏附、基础培养基类型、培养基附加成分、生长因子等）。通过使用荧光指示剂可以完成诸如神经元分化、细胞分析等过程，还可用系统软件进行自动成像分析并记录结果。多重细胞参数能够快速量化，包括细胞计数、轴突外长、核质蛋白定位，以及细胞活性分析。

在高通量分析的使用中，多重因子会增加细胞实验的噪声和变异性。特别是，我们观察到96孔板边缘孔与中央孔的细胞生长的差异，这种现象称之为“边缘效应”（edge effect）。据认为96孔板边缘效应源于板周围的过度蒸发。现已有报道介绍减低该效应的方法［Lundholt et al.，2003］。若试图消除边缘效应，我们发现最好不使用边缘孔，只使用其中的60个孔（6×10）。

3.9.1 微量滴定分析

要测定细胞系对要测试化合物和培养基条件的耐受性，可在96孔板（胶原包被的）的每一个孔中加1000μl标准生长培养液并含有3000个细胞。一旦细胞已经充分贴附（4h之后），将标准生长培养液更换成含化合物的培养液（150μl）。然后隔天换液。

分析化合物对NTERA2细胞的效应，用含5%血清的培养液代替标准生长培养液（10%血清的生长培养液）。减少血清浓度将可降低血清蛋白产生的假象。NTERA2细胞可长期维持在含血清5%的培养液中，但是，它只能在含2.5%血清的培养液中存活大约一周。

3.9.2 活力分析

用细胞健康特性显示溶液对细胞进行活体染色（见表3.2）并在20min内检测。每孔计数约10个视野的细胞数，记录总细胞数。鉴定细胞核，用拆解法进行计数，要将密集堆积的细胞拆分开，计数那些边界清晰，所属范围以内的细胞核，而不是荧光强度。

表3.2 细胞活力特性显示溶液

荧光染料	浓度	荧光
Hoechst 33342（蓝色）	0.8μmol/L	由于细胞毒性使细胞体积缩小
TMRM（红色）	20nmol/L	由于通透性和质膜去极化，线粒体上TMR信号减弱
Fluo-4，AM（绿色）	1μmol/L	由于胞内Ca^{2+}水平升高，Fluo-4信号增强
TOTO-3（远红）	1μmol/L	由于质膜完整性缺失，TOTO-3荧光增强

用Hoechst 33342染色显示细胞核的形态、大小和健康状态，最好用自动分析系统，可以进行恒定的和高通量的分析。通过质膜的缺失以确定死亡或濒死的细胞。由于质膜不完整使得TOTO-3(1,1′-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1-propanediyl]bis[4-[(3-propen-2(3H)-benzoxazoly lidene) methyl]]-tetraiodide)可以通透进入，可使得线粒体跨膜电位消失，通过TMRM（tetramethylrhodamine methyl ester）检测4-AM荧光强度增加，提示濒死细胞胞内钙水平增高。

3.9.3 细胞毒性分析

由于培养基的成分导致细胞毒性，其测定方法是采用比色法（Cytotox 96 非放射性细胞毒性试验，Promega）对乳酸脱氢酶（LDH）活性进行定量分析。细胞裂解释放出 LDH 可使培养基中 tetrazolium 盐转化成一种红色的甲臜产物，其数值与细胞裂解的数量成比例。这可通过分析实验变量的不同类型加以证实，这是因为代谢产物分析易导致误差［如可参阅 Kendig and Tarloff，2006］，并且，这种显著的影响还必须用某种其他的细胞毒性来证实，例如，撤除实验化合物之后的 MTT 试验［Plumb et al.，1989］。

在 96 孔板中接种细胞，8000 个/孔，加 100μl 相应的测试药物或培养液，24h 或 48h 之后分析，按仪器说明书的步骤进行测定，并在读板仪上测定光吸收。

3.9.4 逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）

采用 RT-PCR 分析可以方便地检测多基因表达。其优势是，无论是单层或悬浮生长的细胞群体都可运用 RT-PCR 分析基因表达，前提是细胞要彻底破裂并能够成功提取 RNA。PCR 避免了实验中出现的诸如用抗体标记大量细胞团（EBs 或神经球）的问题。

3.9.4.1 RNA 提取

胰蛋白酶收获细胞，PBSA 重悬细胞。4℃，1200r/min（277*g*）离心 3min 之后，重悬细胞团，要么立即使用该细胞，要么－70℃冻存。采用某种标准方法提取 RNA，如使用 RNeasy Mini Kit（Qiagen，U. K.），依照操作手册进行。

3.9.4.2 逆转录 cDNA 产物（表 3.3）

表 3.3 PCR 试剂

	每 50μl 反应体系	主体混合液
PCR Buffer（10×）	5μl	125μl
$MgCl_2$	1.5μl	37.5μl
dNTPs	0.5μl（25mmol/L 贮存液）	12.5μl
Taq 多聚酶	0.4μl	10μl
引物	1.5μl（×2）10 pM	—
H_2O	38.6μl	965μl

用波长 260nm 的可见光光密度法和 1%（*W*/*V*）琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 浓度。在 37℃，40μl 反应体系中进行 RT 反应，以合成单链 cDNA，该过程需 3h。将以下各成分加入到无 RNA 酶的 1.5ml Eppendorf 管中：5μg 总量的 RNA，2μl Oligo（dT）（0.5μg/μl；MWG Biotech），加 dH_2O 至终体积 29μl。将管于 70℃加热 8min，后置冰上 10min。然后再加入以下试剂：8μl 逆转录酶缓冲液（Promega），1μl 莫洛尼氏小鼠白血病（MML）逆转录酶（Promega），2μl 25mmol/L dNTPs（Promega）。混匀并离心，37℃反应 2～3h，然后 95℃加热 5min。用无 MMLV 作为阴性对照，以确定 RNA 提取过程中无 gDNA 污染。1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应产物（含 1μl 的 RT 反应的 cDNA 溶液）。应用引物与编码 β-肌动蛋白细胞骨架蛋白的 mRNA 杂交，作为 RT-PCR 的内标准（表 3.4）。

表 3.4 引物序列

引物	序列	Tm（℃）	大小（bp）
β-Actin	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	65	838
NeuroD	AAGCCATGAACGCAGAGGAGGACT AGCTGTCCATGGTACCGTAA	55	579
Pax6	GCTGCCAGCAACAGGAAGGAG GTGCCCATTGGCTGACTGTTC	62	600
Sox-2	CCCCCGGCGGCAATAGCA TCGGCGCCGGGGAGATACAT	60	448
Sox-1	CTCACTTTCCTCCGCGTTGCTTCC TGCCCTGGTCTTTGTCCTTCATCC	58	848
Nestin	CACTCCCCTGGGCTTCTACC AGGGGACGCTGACACTTACA	60	508
Hash1	CGCGTGTGCTGCTCCCTTCT GGCTCGCCGGTCTCATCCTA	60	404
GFAP	TCATCGCTCAGGAGGTCCTT CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT	60	400

3.10 材料来源

项目	目录号	供应商
琼脂糖	15510027	Invitrogen
抗体（见表 3.1）		
B27 添加剂	10889-038	Invitrogen（GIBCO）
胶原酶Ⅳ	17104-019	Invitrogen（GIBCO）
冻存器		Nalge Nunc
冻存管		Nalge Nunc
细胞毒性测定	Cytotox 96	Promega
中性蛋白酶	354235	BD Bioscience
DMEM，高糖	41965-039	Invitrogen（GIBCO）
DMEM/F12	21331-020	Invitrogen（GIBCO）
EDTA	E-5134	Sigma
FACS 管	55.476	Sarstedt
胎牛血清，US	16000-044	Invitrogen（GIBCO）
FGF-2	500-P18	Peprotech
培养瓶，25cm^{2}和 75cm^2	430168	Corning Life Sciences

续表

项目	目录号	供应商
	430720	
Fluo 4-AM	Fluka 93596	Sigma
明胶	G1890	Sigma
庆大霉素，50ng/ml	15750-045	Invitrogen（GIBCO）
硫酸乙酰肝素，钠盐	H7640	Sigma
Hoechst 33342 *bis*-联苯胺	B2261	Sigma
重组人胰岛素贮存液（10mg/ml）	I9278	Sigma
胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂	51300-044	Invitrogen（GIBCO）
Knockout DMEM	10829-018	Invitrogen（GIBCO）
Knockout 血清替代品	10829-028	Invitrogen（GIBCO）
L-谷氨酰胺	21051-016	Invitrogen（GIBCO）
微量滴定板，96 孔，胶原 I 包被	354649	BD Biosciences
N2 添加物	17502-048	Invitrogen（GIBCO）
非必需氨基酸，100×	11140-035	Invitrogen（GIBCO）
PA6 基质细胞系		
多聚甲醛	P 1213	Sigma
无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 磷酸缓冲盐溶液（PBSA）	D-PBS 14190	Invitrogen（GIBCO）
读板仪	Wallac 1420 Victor V2	Perkin Elmer
全反式-视黄酸	R 4632	Sigma
四甲基若丹明甲酯（TMRM）	T 5428	Sigma
TOTO3		
Triton X-100	T 9284	Sigma
胰蛋白酶	15090-046	Invitrogen（GIBCO）
β-巯基乙醇	M 7154	Sigma

（董　敏　译）

参考文献

Abraham, V.C., Taylor, D.L., and Haskins, J.R. (2004). High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends Biotechnol.* **22**:15–22.

Andrews, P.W. et al. (2005). The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat. Biotechnol.* **23**:795–797.

Andrews, P.W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.* **103**:285–293.

Andrews, P.W., Banting, G., Damjanov, I., Arnaud, D., and Avner, P. (1984). Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* **3**:347–361.

Andrews, P.W., Meyer, L.J., Bednarz, K.L., and Harris, H. (1984). Two monoclonal antibodies recognizing determinants on human embryonal carcinoma cells react specifically with the liver isozyme of human alkaline phosphatase. *Hybridoma* **3**:33–39.

Andrews, P.W., Nudelman, E., Hakomori, S., and Fenderson, B.A. (1990). Different patterns of glycolipid antigens are expressed following differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid, hexamethylene bisacetamide (HMBA) or bromodeoxyuridine (BUdR). *Differentiation* **43**:131–138.

Andrews, P.W., Oosterhuis, J.W., and Damjanov, I. (1987). Cell lines from human germ cell lines. In: Robertson E (ed), Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach. Oxford; IRL press: 207–248.

Carpenter, M.K. et al. (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp. Neurol.* **158**:265–278.

Cheung, W.M., Fu, W.Y., Hui, W.S., and Ip, N.Y. (1999). Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method. *Biotechniques* **26**:946–948, 950–952, 954.

Clarke, S.R., Shetty, A.K., Bradley, J.L., and Turner, D.A. (1994). Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* **5**:1885–1888.

Conti, L. et al. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* **3**:e283.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**:5046–5061.

Draper, J. and Andrews, P.W. (2004b). Surface antigen markers of embryonic stem cells. In Handbook of Stem Cells (ed. R. Lanza) Elsevier Academic Press, London, 565–571.

Draper, J.S., Moore, H.D., Ruban, L.N., Gokhale, P.J. and Andrews, P.W. (2004a). Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **13**:325–336.

Draper, J.S., Pigott, C., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* **200**:249–258.

Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., and Nirenberg, M. (1979). Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:4913–4917.

Fenderson, B.A., Andrews, P.W., Nudelman, E., Clausen, H., and Hakomori, S. (1987). Glycolipid core structure switching from globo- to lacto- and ganglio-series during retinoic acid-induced differentiation of TERA-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.* 122, 21–34.

Fennell, M., Chan, H., and Wood, A. (2006). Multiparameter measurement of caspase 3 activation and apoptotic cell death in NT2 neuronal precursor cells using high-content analysis. *J. Biomol. Screen.* **11**:296–302.

Gallo, V. and Armstrong, R.C. (1995). Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. *J. Neurosci.* **15**:394–406.

Gerrard, L., Rodgers, L., and Cui, W. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells* **23**:1234–1241.

Guillemain, I., Alonso, G., Patey, G., Privat, A., and Chaudieu, I. (2000). Human NT2 neurons express a large variety of neurotransmission phenotypes in vitro. *J. Comp. Neurol.* **422**:380–395.

Hartley, R.S., Margulis, M., Fishman, P.S., Lee, V.M. and Tang, C.M. (1999). Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **407**:1–10.

Hockfield, S. and McKay, R.D. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* **5**:3310–3328.

Itskovitz-Eldor, J. et al. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* **6**:88–95.

Kanemura, Y. et al. (2001). Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation* **68**:141–152.

Katsetos, C.D., Herman, M.M., and Mork, S.J. (2003). Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil. Cytoskeleton* **55**:77–96.

Kawasaki, H. et al. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**:31–40.

Kendig DM, Tarloff JB. (2006). Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: Implications for in vitro toxicology studies. *Toxicol. In vitro* **21**:125–32.

Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W., and Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* **17**:118–132.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**:585–595.

Leypoldt, F., Lewerenz, J., and Methner, A. (2001). Identification of genes up-regulated by retinoic-acid-induced differentiation of the human neuronal precursor cell line NTERA-2 cl.D1. *J Neurochem* **76**:806–814.

Li, M., Price, D., and Smith, A. (2001). Lineage selection and isolation of neural precursors from embryonic stem cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **53**:29–42.

Lundholt, B.K., Scudder, K.M., and Pagliaro, L. (2003). A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J. Biomol. Screen* **8**:566–570.

Marchal-Victorion, S. et al. (2003). The human NTERA2 neural cell line generates neurons on growth under neural stem cell conditions and exhibits characteristics of radial glial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**:198–213.

Martin, G.R., Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1441–5.

Matin, M.M. et al. (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* **22**:659–668.

Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., and McKay, R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* **59**:89–102.

Okano, H. et al. (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res* **306**:349–356.

Pera, M.F. et al. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci* **117**:1269–1280.

Pleasure, S.J., Page, C., and Lee, V.M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* **12**:1802–1815.

Plumb, J. A., Milroy, R., and Kaye, S. B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* **49**:4435–4440.

Przyborski, S.A., Morton, I.E., Wood, A., and Andrews, P.W. (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur. J. Neurosci.* **12**:3521–3528.

Rutishauser, U., Hoffman, S., and Edelman, G.M. (1982). Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:685–689.

Saporta, S. et al. (2004). Rapid differentiation of NT2 cells in Sertoli-NT2 cell tissue constructs grown in the rotating wall bioreactor. *Brain Res. Bull.* **64**:347–356.

Schachner, M., Kim, S.K., and Zehnle, R. (1981). Developmental expression in central and peripheral nervous system of oligodendrocyte cell surface antigens (O antigens) recognized by monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* **83**:328–338.

Schulz, T.C. et al. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem Cells* **22**:1218–1238.

Schwartz, C.M. et al. (2005). NTera2: a model system to study dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **14**:517–534.

Shin, S. et al. (2006). Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cells* **24**: 125–38.

Sommer, I. and Schachner, M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev. Biol.* **83**:311–327.

Squires, P.E. et al. (1996). Regulation of intracellular Ca^{2+} in response to muscarinic and glutamate receptor agonists during the differentiation of NTERA2 human embryonal carcinoma cells into neurons. *Eur. J. Neurosci.* **8**:783–793.

Street, C.N. et al. (2004). Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker. *J. Endocrinol.* **180**:213–225.

Strickland, S. and Mahdavi, V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**:393–403.

Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., and Mori, K. (2000). Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* **11**:1991–1996.

Zeng, X. et al. (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**:925–940.

Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**:1129–1133.

第 4 章　人胚胎干细胞向心肌细胞的分化

CHRISTINE MUMMERY

Hubrecht Laboratory, Interuniversity Cardiology Institute of the Netherlands and the Heart Lung Centre, University of Utrecht Medical School, Hubrecht Laboratory, Uppsalalaan 8, 3583 CT Utrecht, The Netherlands. Corresponding author: christin@niob. knaw. nl

4.1　引言

人胚胎干细胞（hESC）在培养的过程中具有分化成心肌细胞的潜力。首先它们作为具有节律性收缩的细胞团是非常容易辨认的。进一步详细的电生理和免疫组织化学分析显示，这些细胞团具有心肌细胞的特征，它们的表型谱与在妊娠 8～10 周的正常人胎心中发现的细胞相似 [reviewed in Boheler et al., 2002; Passier and Mummery, 2005]。因此，它们对于研究人类早期心脏发育过程中的细胞分化是十分有意义的，同时对于探索人类心肌细胞的生理学与药理学特性（包括它们对心脏药物的反应）也有一定意义。在将来的某个时间，它们也许可能作为一种可移植细胞用来修复心肌，替代因缺血损伤所失去的心肌细胞。

这个分化方案对于诱导 hESC 分化成心肌细胞是十分有效的，它部分依赖于所使用的特定 hESC 细胞系，也部分依赖于分化之前所使用的增殖方法。这里要描述几种用来产生和区分从 hESC 分化而来的心肌细胞的方法，它与把心肌细胞分离成单细胞悬液的

方法一样有效，制备单细胞悬液可以用于抗体标记区分细胞和电生理检测细胞，它也用于制备移植入（动物）心脏的细胞。

4.2 方法概述

目前所应用的许多方法都是基于小鼠胚胎干细胞（mESC）的研究发展，即研究混悬液中被称作胚胎样小体（EB）的聚集体结构。在聚集物形成后的4～10天（这依赖于聚集物的细胞数量或细胞系），许多小鼠胚胎干细胞将开始自发地跳动。据信，在EB的胚外内胚层的外侧形成一种外层结构可能是重要的分化信号的来源，因为已知在许多物种内胚层的正常发育过程中，内胚层是十分重要的。在心脏形成过程中，这种外侧结构也向前中胚层发出信号。未分化干细胞向心肌细胞的转变通常是一个低效率的过程。关于如何改善这种效率，许多文献都把思路集中于在细胞生长为EB的过程中激活特定的发育相关信号通路。现已证实，*wnt* 和骨形态形成蛋白（BMP）信号通路是最具上述潜力的。

从hESC获得心肌细胞的首次报道［Kehat et al.，2001］出现在最先报道从胚泡期胚胎获得hESC的大约三年之后［Thomsonet al.，1998］。为了诱导心肌细胞的分化，首先应用胶原酶Ⅳ把hESC（细胞系H9.2）消化分散为小的细胞团（3～20个细胞），随后让细胞团在悬浮状态下生长7～10天形成胚胎样小体结构。它们与小鼠胚胎干细胞（mESC）的形态相似，只是没有清晰的内胚层细胞的外侧结构。把这些EB移植到明胶包被的培养皿中培养，自然生长4天后（在开始进行分化操作后的11～14天），可以第一次观察到搏动区域。在植入培养皿后20天，搏动区域数目达到最多（在分化开始后的第27～30天），在1884个胚胎样小体（EBs）中，8.1%是跳动的。使用不同的细胞系也发现在聚集体内存在自发分化为心肌细胞的现象，例如，H1、H7、H9、H9.1和H9.2［Xu et al.，2002］。但是，这篇文章里报道，在分化20天后跳动的EBs中大概占到70%。在分化操作的第8天（接种在培养皿内悬浮生长）有25%的EBs在跳动。第三组实验也显示，从hESC细胞系（H1、H7、H9和H14）可以自发分化成心肌细胞，但是在这种情况下，有10%～25% EBs是在分化后30天开始跳动的［He et al.，2003］。出现这种效率差异的原因还不十分清楚。此外，由于不同的EBs可能含有的心肌细胞数量明显不同，因此计算搏动的EBs数目的方法可能不能精确地反应从hESC到心肌细胞的转变过程。最近，又有文献报道了两种独立的hESC细胞系即BG01和BG02的分化过程［Zeng et al.，2004；Denning et al.，2006］。用胶原酶Ⅳ把hESC分离成小细胞团后，以EBs悬浮培养7天，之后转到附着板内继续培养7天。在此情况下，已证实具有心肌标记物——心肌肌钙蛋白I的免疫反应性。

Mummerv等描述了另一种诱导hESC发育成心肌细胞的方法［Passier et al.,2005；Mummery et al.，2002，2003］。hES2细胞［Reubinoff et al.,2002］与小鼠脏壁内胚层样细胞系（END2）共培养后，可以观察到搏动的区域。内胚层在心源性前体细胞（位于体内邻近中胚层的位置）分化过程中起到了重要的作用。在END2细胞、小鼠P19胚胎癌细胞（一种具有多向分化特性的胚胎癌性细胞系）与mESCs共培养的早期，在细胞聚集处可以观察到搏动的区域出现并且证实被END2生长过的条件培养基具有心

肌源性效能［van den Eijnden-vanRaajj et al.,1991］。为了诱导 hESCs 向心肌细胞分化，在 12 孔板上接种失去有丝分裂能力的 END2 细胞，并且使其与 hESC 细胞系 hES2 共培养，在共培养 12 天后，可以看到每孔内大约 35% 的区域存在着搏动现象［Mummery et al., 2003］。

虽然这些方法是有效的，但是所有生成心肌细胞的方法，它们的效率都是很低的。已经在 hESC 中测试了几种潜在的心脏发生因子：加入 DMSO、维甲酸［Kehat et al., 2001；Xu et al., 2002］或者 BMP-2［Mummery et al.,2003；Pera et al.,2004］均不能显著提高心肌细胞的分化效率。是否这些因子对诱导 hESC 向心肌细胞分化没有作用，或者是否这还不是最佳的分化方案，现在还不十分清楚。脱甲基试剂——5′-脱氧氮胞苷（5′-deoxyazacytidine）是一种能够促进 hESC 向心肌细胞分化的因子。用 5′-脱氧氮胞苷处理 hESC 聚集体提高向了心肌细胞的转化，实时 RT-PCR 测定表明心肌 α-肌球蛋白重链的表达提高了两倍［Xu et al.,2002］。

在分化过程中，胎牛血清对于分化效率也是一种重要的影响因子。迄今为止，大部分文献中都报道，培养基中含有血清，并且分化效率依赖于血清的批次。血清中可能含有抑制因子。例如，Sachinidis 等［2003］观察到，使用无血清分化培养基后，小鼠 EBs 细胞的搏动百分率上升了 4.5 倍。我们最近也观察到，在用无血清培养基进行 hES2-END2 共培养的情况下，心肌细胞的产生率提高了 20 倍以上［Passier et al., 2005］，维生素 C 可以进一步提高这种产率。虽然也可以看到心房和起搏样细胞，但是用这个操作方案产生的大部分心肌细胞（约 90%），它们的表型更加类似于人胎儿心室细胞［Mummery et al., 2003］。这里所描述的无血清操作方案主要针对 hES2 和 hES3 细胞。

4.3　培养基与试剂的准备

4.3.1　饲养细胞培养基

4.3.1.1　MEF 培养基

(i) GMEM (BHK-21)，1× ………… 500ml
(ii) L-谷氨酰胺，200 mmol/L (100×) ………… 5ml
(iii) 丙酮酸钠，100 mmol/L ………… 5ml
(iv) 非必需氨基酸，100× ………… 5ml
(v) 胎牛血清 (FBS) ………… 50 ml
注意：为保证 ESCs 的最佳生长，每批 FBS 都应检测；Perbio 是供应厂商之一。
(vi) 青霉素-/链霉素，100× ………… 5 ml

4.3.1.2　END2 培养基

DMEM/F12 (1∶1) 含有 L-谷氨酰胺 2.5 mmol/L，青霉素 10 U/ml，链霉素 10μg/ml，FBS 7.5%

4.3.2 hESC（hES2 和 hES3）培养基

4.3.2.1 标准培养基

DMEM（高葡萄糖）含有：

	(V/V)	终浓度
(i) L-谷氨酰胺 200 mmol/L	1：100	2 mmol/L
(ii) 青霉素-链霉素	1：200	25U/ml，25μg/ml
(iii) 非必需氨基酸	1：100	
(iv) 胰岛素，转铁蛋白，硒（ITS-G）	1：100	
(v) 2-巯基乙醇		1.8μl/ml 培养基
(vi) 胎牛血清		20%

(vii) 一经混合，用 Stericup-GV 过滤器过滤培养基

4.3.2.2 不含血清的 hESC 培养基

与标准培养基相似，但是不含有血清。

4.3.3 hESC 心肌细胞的分离缓冲液

需要三种缓冲液；表 4.1 所显示的体积是每种缓冲液 100ml。过滤灭菌，－20℃贮存。

表 4.1　缓冲液的准备

缓冲液	1：低-Ca	2：酶	3：KB
NaCl，1.0mol/L	12ml	12ml	—
$CaCl_2$，1.0 mol/L	—	3μL	—
K_2HPO_4，1.0 mol/L	—	—	3ml
KCl，1.0 mol/L	0.54ml	0.54ml	8.5ml
Na_2ATP	—	—	2mmol/L
$MgSO_4$，1.0 mol/L	0.50ml	0.50ml	0.50ml
EDTA，1.0 mol/L	—	—	0.1ml
丙酮酸钠，1.0 mol/L	0.50ml	0.50ml	0.50ml
葡萄糖，1.0 mol/L	2ml	2ml	2ml
肌酸，0.1 mol/L	—	—	5ml
牛磺酸，0.1 mol/L	20ml	20ml	20ml
胶原酶 A	—	1mg/ml	—
HEPES，1.0 mol/L	1ml	1ml	—
pH（用 NaOH 校正）	6.9	6.9	7.2

注意：

(1) 当制备缓冲液 3 (KB) 时，不要加入葡萄糖。否则在－20℃会形成沉淀；使用之前加入葡萄糖。

(2) 制备缓冲液 3 时，在最后一步加入 K_2HPO_4，否则会形成沉淀。

(3) 分离搏动细胞团使之成为单个心肌细胞，胶原酶 A 的批次可能影响其效率。建议对批次进行检验。我们使用罗氏 (Roche) 的胶原酶。

4.3.4　涂铺明胶的培养瓶、培养板或培养皿

(i) 明胶 0.1%：用 25ml 蒸馏水溶解 0.5g 明胶，并且高压灭菌。之后，将这种热明胶加入到 475ml 蒸馏水中，室温下保存。

(ii) 以 1ml/cm^2 的量滴加于培养瓶、培养板或培养皿上，室温下保持 5min，之后去除多余液体。

(iii) 无菌层流环境下干燥过夜，之后，保存于 4℃环境下直至使用。

4.4　hESC 分化为心肌细胞的操作方案

据报道，"切割与粘贴"的方法对于保护核型稳定性是最有效的。但是，大多数 hESC 细胞系能够适应于大批量的培养方法（胰蛋白酶消化，胶原酶消化），并且它们能培养在小鼠胚胎成纤维细胞（MEFs；见方案 4.4）或人饲养细胞（例如包皮成纤维细胞）之上。在我们的实验里，hES2 和 hES3 细胞的常规传代，每周进行一次，培养于 MEFs 之上。在传代过程中，集落直径通常是 0.5～2 mm，但是不会发生汇合。

方案 4.1　用"切割与粘贴"的方法对 hESC (hES2 和 hES3) 进行传代

试剂与材料

无菌或无菌制备

- ☐ 培养于器官培养皿中的 hES2 或 hES3 细胞
- ☐ 培养于器官培养皿中的 MEF 饲养层，新鲜制备（见方案 4.5）
- ☐ 标准 hESC 培养基（见 4.3.2.1 节）
- ☐ 含 Ca^{2+} 和 Mg^2 的 Dulbecco's PBS (D-PBS)
- ☐ 中性蛋白酶溶液，10 mg/ml 溶于标准 hESC 培养基，新鲜配制，过滤灭菌。
- ☐ 2 个 Petri 培养皿，3.5cm，加入 D-PBS，37℃培养箱内孵育。
- ☐ 将玻璃针在火焰上加热、拉长，断成两段。在传代之前高压灭菌。
- ☐ 无菌滤器，0.22μm
- ☐ 黄色移液器枪头 (10～200μl)

非无菌

- ☐ 微量移液器，100μl
- ☐ 4×放大率立体解剖显微镜（如果可能的话，用加热载物台）

步骤

(a) 检查培养物，选择含有未分化 hESC 集落的培养皿。

(b) 利用玻璃针切割集落（类似切割比萨），选择未分化的“小块”传入新的培养皿中（图 4.1）去除已分化部分对于长期培养未分化细胞是非常重要的。在立体解剖显微镜下用 4×放大视野操作是最便利的。

(c) 去除培养基，加入 0.5ml 中性蛋白酶溶液。

(d) 把培养皿放入培养箱大约 2min，或者有可能的话，将其放在加热的显微镜载物台上。

(e) 从培养箱中将预热的含有 D-PBS 的培养皿取出。

(f) 从中性蛋白酶处理的培养皿中挑出未分化的集落；使用 100μl 带有黄枪头的移液器转移集落到第一个含有 D-PBS 的培养皿内，接着转移到第二盘，这样做的结果就是用 D-PBS 洗了两遍。

(g) 将这些集落均匀地分配到一个新准备的含 MEF 饲养层的器官培养皿内（见方案 4.5），培养皿内含有 1 ml 标准 hESC 培养基（见 4.3.2 节），每皿含有大约 9 个集落。不应该将集落的接种过于接近皿的边缘或是一个挨着一个，以便为集落生长提供足够的空间和便于下次传代。

(h) 将器官培养皿小心地置于 5%CO_2、37℃培养箱中。

(i) 每天用标准 hESC 培养基换液。

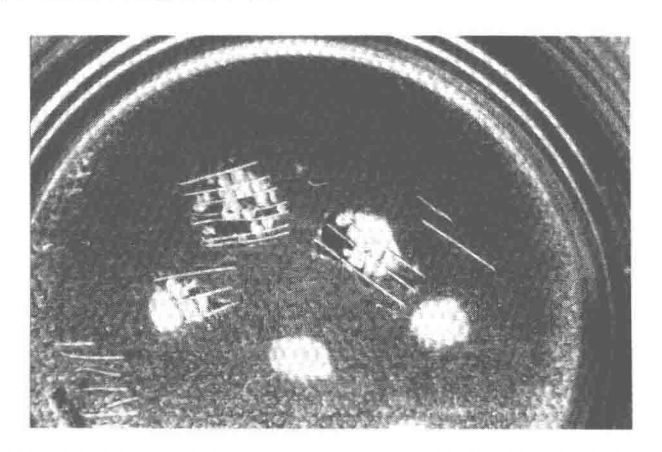


图 4.1　中性蛋白酶消化“切割” HES2 细胞集落进行传代。每个集落含约 5000 个细胞。仍可见完整的集落如白色的圆盘（见方案 4.1 hESC 培养）。图片经 Dorien Ward-van Oostwaard 许可

培养 hESC 的饲养细胞的注意事项

(1) γ 射线照射过的饲养细胞（25 Gy 悬挂式照射）也可使用、冷冻和储藏。对于用切割和粘贴的方法传代的 hESC 细胞系，为了最佳的核型稳定性，要使用经丝裂霉素 C 处理的新鲜饲养细胞。饲养细胞培养皿和培养板应该在 48h 之后使用，但超过 4 天便不可用于 hESC 集落的传代。传代数取决于每个实验室所使用的 MEFs 而不相同，通常

情况下，低传代数（p）细胞更合适，例如，p4（平分比率 1∶2；最大 1∶4），即使一些实验室能够使饲养细胞传代次数达到 p7。

（2）前面已经描述过低密度传代，我们通常使用一个饲养细胞密度（每器官培养皿 $1.70\times10^5\sim1.75\times10^5$ 个，每平方厘米约 7×10^4 个）。饲养细胞密度能够影响集落形态——高密度培养的情况下，集落可能呈现出隆起而不是扁平的。

（3）为培养 hESC 而准备小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）的量取决于每只鼠的繁殖效率和胚胎数，以及所分离的原始成纤维细胞的初期生长情况。细胞生长率决定着饲养细胞的质量（快速生长通常表明有更好的能力支持 hESC 的自我更新），也决定着有多少可生长至汇合的饲养细胞的瓶数，并于 p4～p5 时可转入 MEF 冻存管内。为了培养 hESC，这些冷冻管每周解冻一次，生长至汇合后再用丝裂霉素 C 处理，随后用于 hESC 的传代。

（4）为了避免使用饲养细胞，有些 hESC 细胞系也可培养于 Matrigel 或细胞外基质层（例如层粘连蛋白或纤连蛋白）之上，或者用含有碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）的 MEF-条件培养基来培养［Rosler et al，2004；Xu et al.,2001］)。用于制备条件培养基的细胞可以重复使用 7～10 天，条件培养基可以冷藏保存直到使用。

方案 4.2　与 END2 共培养的 hES2 和 hES3 向心肌细胞的分化

试剂与材料

无菌或无菌准备

- ☐ 用于两块 12 孔 hESC-END2 共培养板的起始材料为：12 个器官培养皿，每个含有 9～10 个集落（hES2 或 hES3）（见方案 4.1）。
- ☐ 12 孔板内有丝裂霉素 C 处理过的 END2 细胞（见方案 4.6）。
- ☐ 无血清 hESC 培养基（见 4.3.2.2 节）。
- ☐ 标准 hESC 培养基（见 4.3.2.1 节）。
- ☐ D-PBS
- ☐ 中性蛋白酶消化液，10mg/ml 溶于标准 hESC 培养基，新鲜配制，过滤除菌。
- ☐ 蓝色移液器枪头（200～1000μl）。

非无菌

- ☐ 1 ml 移液器

步骤

（a）在接种 hESC 细胞团之前至少 1.5h，用不含 FBS 的 hESC 培养基为经过丝裂霉素 C 处理的 END2 细胞换液。

（b）准备用来清洗未分化 hESC 集落的平皿：

　i）在 6 个直径 3.5cm 的平皿中加入 D-PBS 液。

　ii）将 1 ml 标准 hESC 培养基（即含有 FBS）加入到两个器官培养皿内。

　iii）把所有平皿放置在 37℃、5%CO_2 的培养箱内。

(c) 将0.5 ml中性蛋白酶加入器官培养皿内，将其置于培养箱7 min，从MEFs中分离hESC集落。

(d) 用带有蓝吸头的1ml移液器从12个器官培养皿内收集所有未分化的hESC集落，然后将其放在3个预先装有D-PBS的平皿内洗涤。

(e) 把集落转移到3个新的含有D-PBS的平皿内（去除连在集落上的MEFs细胞）。

(f) 将这些集落转移到2个含有1ml标准hESC培养基的器官培养皿内（见4.3.2.1节）。

(g) 用1ml移液器对着平皿底部使劲上下吹吸（根据集落的大小吹吸2～3次），将集落分散成小块（见方案4.1）。

(h) 将hESC小细胞团转移到2个12孔盘内（含有汇合的丝裂霉素C处理过的END2细胞）。

(i) 在第5，9，12天更换培养基。

(j) 在接种12天后，用镜检方法评测搏动区域。搏动通常始于第5～7天，在第12天时达到最强。用抗α-肌动蛋白（1∶800稀释）和抗原肌球蛋白（1∶400稀释）的抗体进行免疫染色，可以显示搏动区域内心肌细胞的数量，通常占20%～25%。作为另外一种选择，蛋白质印迹法也可以用来量化（例如，用肌钙蛋白I抗体；1∶100稀释）。

---

hESC分化为心肌细胞的注意事项

(1) 小鼠和人的ES细胞向心肌细胞分化的效率是不同的。如果分化不是在无血清培养基中进行，那么每个胚体内细胞的数量和FBS批次就是重要的因素。建议测定不同批次FBS的分化效率，选择最好的一批用以所有后续分化实验。

(2) 小鼠ES细胞对END2的共培养也会有反应，mESC与END2细胞的共培养以单细胞悬液形式开始，细胞开始聚集，大约3天后细胞团与END2细胞接触，向外生长并分化。大概8天后开始出现搏动区域[Mummery et al., 2002]。与mESCs的共培养通常是在含有血清的培养基内进行的，它能促进细胞存活。

(3) 一些hESC细胞系在与END2共培养时反应最好，而其他一些细胞系以聚集状态生长在END2条件培养基内反应较好，例如，之前所描述的多能P19胚胎癌细胞[van den Eijnden-vanRaaij et al.,1991]。hESC培养基与汇合的单层END2细胞共培养4天可被条件化。

方案4.3 hESC来源的心肌细胞的分离

试剂与材料

无菌

☐ 共培养皿（见方案4.2）

☐ 标准hESC培养基（见4.3.2.1节）

- □ 分离缓冲液（见 4.3.3 节和表 4.1）
  缓冲液 1，低 Ca^{2+}
  缓冲液 2，酶缓冲液
  缓冲液 3，KB
- □ Petri 培养皿，3.5 cm
- □ 0.1%明胶包被的盖玻片或平皿
- □ 蓝色移液器枪头（200～1000μl）
- □ 精细手术剪（例如，虹膜切除剪）

非无菌

- □ 石蜡封口膜
- □ 1 ml 移液器

步骤

(a) 使用剪刀从共培养板内将搏动区域切割分离出来，并用含有 FBS 的标准 hESC 培养基收集切割的组织。

(b) 分离过程需要三种缓冲液（见 4.3.3 节）。开始分离时，使用带蓝色枪头的移液器将切割的组织小块转移到含有缓冲液 1 的平皿中，室温下保持 30 min。

(c) 把细胞团块从缓冲液 1 转移到缓冲液 2，在 37℃下孵育约 45min（在移入 CO_2 培养箱前，用封口膜封住皿口）。

(d) 将细胞团从缓冲液 2 转移到缓冲液 3 内，在无旋轴摇床（nonpivoting shaker）上以 100r/min 的速度轻缓摇动，室温 1h。

(e) 将细胞团从缓冲液 3 转移到含有 20%FBS 的标准 hESC 培养基内，促进其黏附和存活。用 1ml 移液器对着皿底上下吹吸（2～4 次）打散细胞团。所需的分散程度取决于用心肌细胞所做的不同试验：

i）向动物体内移植或进行免疫荧光染色，获得细胞团和单细胞的混合物就足以满足试验了。

ii）电生理试验需要分散的单细胞。

注意：心肌细胞是十分脆弱的！假如吹吸的太过于激烈，细胞在体内或体外都将不能恢复生长。

(f) 为了进行电生理和免疫荧光染色试验，需要用标准 hESC 培养基，在 37℃环境下将分离的搏动区域接种到涂有明胶的盖玻片或培养皿上。

(g) 为了用于电生理试验，要让细胞在盖玻片上生长至少两天，最长达到一周。

(h) 为了移植入小鼠心脏，要使分散的细胞在 hESC 培养基中保持悬浮状态，置于冰上，保持在 4℃。向左心室壁注射 1×10^5～1×10^6 个细胞，体积是其所能接受培养基的最大量：15μl，大容量能引起心肌组织的瘢痕化。

方案 4.4 小鼠胚胎饲养细胞（MEF）的分离培养

试剂与材料

无菌

- ☐ 通过检查阴道栓（=0 天）记录了孕龄的妊娠小鼠
- ☐ MEF 培养基（见 4.3.1 节）
- ☐ 冻存培养基：含有 20%DMSO 的 MEF 培养基
- ☐ PBSA：不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 D-PBS
- ☐ 胰蛋白酶/EDTA：0.05%胰蛋白酶，0.5mmol/L EDTA 溶于不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's BSS
- ☐ 离心管，15 ml
- ☐ 冷冻小管（冻存管）
- ☐ 分离器械
- ☐ 注射器，18G 和 21G 针头

步骤

(a) 无痛处死怀孕 E13.5 天的母鼠。

(b) 分离胚胎，用 PBSA 清洗一次：

i) 从小鼠体内取出子宫，分离出各个胚胎［Freshney，2005］。

ii) 去除头与内脏器官（肝脏、心脏、肺等）。

iii) 用 PBSA 清洗胚胎两次。

(c) 将胚胎移入直径 3 cm 的细菌平皿，每皿放两个胚胎。

(d) 加入少量 PBSA，用两把交叉的手术刀片将两个胚胎切成细小的小块。

(e) 每个胚胎加入 1 ml 胰蛋白酶/EDTA。

(f) 室温下放置 10min，同时轻轻摇晃平皿。另一种方法是，将胚胎于 4℃ 放置 18h，而后在 37℃ 孵育 10～20min；这种可增进产率和活力的方法已经介绍过（见 Freshney［2005］）。

(g) 先用带有粉红色 18G 针头的注射器，之后换成绿色 21G 针头，将经消化的组织分离成单细胞悬液。把细胞悬液转移到试管，每个胚胎加 5ml MEF 培养基（见 4.3.1 节）。

(h) 使大块组织碎片沉降，将上清液转移入干净的离心管，250g 离心 5min。

(i) 用 MEF 培养基重悬细胞沉淀，以大约每瓶一个胚胎的量，将混悬液接种于 $175cm^2$ 组织培养瓶内。

(j) 培养细胞 24～48h，胰蛋白酶消化。

(k) MEF 培养基重悬细胞。

(l) 与冻存液 1∶1 混合，分装入冷冻小管（冻存管），每个胚胎装入两个冻存管。

(m) 按标准步骤冷冻（见 Freshney［2005］，第 20 章）。

有关 MEFs 的注意事项

用于分离 MEF 的小鼠品系可能对一些 hESC 细胞系的自我更新起到重要作用。在

我们的试验中，hES2 和 hES3 适宜生长在 129Sv 品系的 MEFs 上面，HUES 1 和 7 适宜生长在 CD1 或 129Sv 品系的 MEFs 上面，两者都可在人包皮成纤维细胞上生长。

方案 4.5　与 hESC 细胞共培养时丝裂霉素 C 对 MEFs 的处理

试剂与材料

无菌或无菌准备

☐ 冻存管，1.5 ml，含有 MEF 细胞（见方案 4.4）
☐ MEF 培养基（见 4.3.1 节）
☐ 标准 hESC 培养基（见 4.3.2 节）（在 24 h 和 48 h 后用来更新培养基）
☐ PBSA
☐ 丝裂霉素 C 的贮存液：用 1ml PBSA 溶解 2mg 瓶装丝裂霉素 C，过滤除菌。
☐ 胰蛋白酶/EDTA：0.05% 胰蛋白酶，0.5 mmol/L EDTA 溶于不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's BSS 液。
☐ Falcon 35-3037 中央孔器官培养皿（0.1%明胶包被）。
☐ 注射器针头，18G
☐ 注射器滤器，1×0.22μm
☐ 注射器，2.5ml

非无菌

☐ 丝裂霉素 C，2mg 包装

步骤

(a) 在 75cm² 组织培养瓶内，使 MEFs 生长到开始汇合。

(b) 用丝裂霉素 C 处理（5μl 储存液/ml 培养基；终浓度 10μg/ml）至少 2⅔ h*，3h 是最大极限。

(c) 用过量的 MEF 培养基清洗 1 次。

(d) 用 PBSA 清洗 2 次。

(e) 胰蛋白酶消化（胰蛋白酶/EDTA）最多 2min。

(f) 以每器官培养皿 1.75×10^5 个细胞重新接种，皿内加 1ml 培养基。

方案 4.6　与 hESC 细胞共培养时丝裂霉素 C 对 END2 的处理

试剂与材料

无菌或无菌准备

☐ END2 细胞，可以在填写完物品转移协议后（www.niob.knaw.nl），从 Hubrecht 实验室的 Christine Mummery 处获得，e-mail:christin@niob.knaw.nl

* 可能有误，原文如此，似为 2¾h——译者注。

□ END2 培养基（见 4.3.1.2 节）
□ 丝裂霉素 C 贮存液，2 mg/ml
□ PBSA
□ 胰蛋白酶/EDTA
□ 组织培养瓶，25 cm^2，涂覆 0.1%明胶（见 4.3.4 节）。
□ 组织培养瓶，175 cm^2，涂覆 0.1%明胶（见 4.3.4 节）。
□ 多孔板，12 孔，涂覆 0.1%明胶（见 4.3.4 节）。
□ 涂有 0.1%明胶的盖玻片放在 12 孔板内（见 4.3.4 节）。

步骤

(a) 第 1 天（最好是星期一），用 END2 培养基将 END2 细胞接种于一个涂有 0.1%明胶的 25cm^2组织培养瓶（见 4.3.1.2 节）。END2 细胞以 1∶8 的比例从已汇合的培养瓶中转出。

(b) 第 5 天，将先前的 25cm^2培养瓶中所有 END2 细胞接种在一个涂有 0.1%明胶的 175cm^2培养瓶内。

(c) 第 8 天，175cm^2培养瓶内细胞应该生长到 100%汇合，准备用于丝裂霉素 C 处理，如 MEFs 所描述（见方案 4.5）。

(d) 加入丝裂霉素 C，每 ml 培养基加 2mg/ml 的贮存液 5μl，达到终浓度 10μg/ml。

(e) 将培养瓶置于 37℃培养至少 2¾h，最长 3h。

(f) 吸出培养基；用 END2 培养基清洗孔一次，再用 PBSA 清洗 2 次。

注意：含有丝裂霉素 C 的废液具有很高毒性。

(g) 胰蛋白酶消化，细胞计数。

(h) 用 END2 重新悬浮细胞。

(i) 当需要做进一步实验时，在涂有 0.1%明胶的 12 孔板或涂有明胶的直径 1.5cm 盖玻片上，以 1.75×10^5/ml 的细胞浓度接种细胞。

4.5 材料来源

项目	目录编号	供应厂商
抗体：		
α-肌动蛋白，小鼠单抗	A7811	Sigma
原肌球蛋白兔多抗	AB1627	Sigma
肌钙蛋白 I	AB1627	Chemicon International
胶原酶 A	11088793001	Roche
中性蛋白酶	17105-041	Invitrogen

续表

项目	目录编号	供应厂商
DMEM（高葡萄糖）	11960-044	Invitrogen
DMEM/F12（1∶1）	31331-028	Invitrogen
DMSO	D-2650	Sigma
D-PBS	14040-91	Invitrogen
不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS（PBSA）	14190-094	Invitrogen
胎牛血清（FBS）	SH30070. 03	Hyclone
	Lot APA20428	Perbio
	14-506F	Cambrex
过滤器，微孔滤膜-GV	SC GVU05RE	Millipore
明胶	G1890	Sigma
L-谷氨酰胺 200mmol/L，100×（5ml）	25030-024	Invitrogen
GMEM（BHK-21），1×（500ml）	21710-025	Invitrogen
胰岛素、转铁蛋白、硒（ITS）	41400-045	Invitrogen
2-巯基乙醇	31350-010	Invitrogen
丝裂霉素 C（5×2mg）	M0503	Sigma
非必需氨基酸，100×	11140-035	Invitrogen
器官培养皿，中央孔（0.1%明胶包被）	Falcon 35-3037	B-D Biosciences
青霉素-链霉素，100×（5000U/ml 青霉素，5mg/ml 链霉素）	15070-063	Invitrogen
丙酮酸钠，100mmol/L（5ml）	11360-039	Invitrogen
滤器，微孔滤膜 0.22μm	SCGV05RE	Millipore
胰蛋白酶/EDTA（100ml）	25300-054	Invitrogen

（孙　冰　译）

参考文献

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**: 189–201.

Denning C, Allegrucci C, Priddle H, Barbadillo-Munoz MD, Anderson D, Self T, Smith NM, Parkin CT, Young LE. (2006). Common culture conditions for maintenance and cardiomyocyte differentiation of the human embryonic stem cell lines, BG01 and HUES-7. *Int. J. Dev. Biol.* **50**:27–37.

Freshney, R.I. (2005). Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, pp. 176–180.

He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ. Res.* **93**:32–39.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitch-

Eldor J, Gepstein L (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* **108**:407–414.

Mummery C, Ward D, van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Opthof T, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, van der Heyden M, Pera M (2002). Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J. Anat.* **200**:233–242.

Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L. (2003). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* **107**:2733–40.

Passier R, Mummery, C.L. (2005). Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**:498–502.

Passier R, Ward-van Oostwaard D, Snapper J, Kloots J, Hassink R, Kuijk E, Roelen B, Brutel de la Riviere A, Mummery C (2005). Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* **23**:772–780.

Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Ward-van Oostwaard D, Mummery C.(2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J. Cell Sci.* **117**:1269–80

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2002) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**:399–404.

Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, Carpenter MK (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* **229(2)**:259–74.

Sachinidis A, Gissel C, Nierhoff D, Hippler-Altenburg R, Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2003) Identification of platelet-derived growth factor BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum free conditions **Cell Physiol. Biochem.** *13*:423–429.

Thomson JA, Itskovitch-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145–1147.

van den Eijnden-vanRaaij AJ, van Achterberg TA, van der Kruijssen CM, Piersma AH, Huylebroeck D, de Laat SW, Mummery CL (1991). Differentiation of aggregated murine P19 embryonal carcinoma cells is induced by a novel visceral-endoderm specific FGF-like factor and inhibited by activin A. *Mech. Dev.* **33**:157–165.

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. (2001). Feeder- free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**:971–4.

Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ. Res.* **91**:501–508.

Zeng X, Miura T, Luo Y, Bhattacharya B, Condie B, Chen J, Ginis I, Lyons I, Mejido J, Puri RK, Rao MS, Freed WJ (2004). Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells* **22**:292–312.

第5章　人生殖细胞谱系的培养

LEE TURNPENNY and NEIL A. HANLEY
Centre for Human Development，Stem Cells & Regeneration and Human Genetics Divison，University of Southampton，Duthie Building，Mailpoint 808，Southampton General Hospital，Tremona Road，Southampton SO16 6YD，UK
i. w. turnpenny@soton. ac. uk；n. a. hanley@soton. ac. uk

5.1 引言

5.1.1 人生殖细胞培养的目的

本章关注的是胚胎生殖细胞（EGC），目的是提供一系列实验方案，利用这些实验方案有望了解 EGC 与其他人干细胞之间的关系。

前几章介绍了胚胎干细胞（ESCs），EGCs 在许多方面与 ESCs 类似。尽管 ESCs 来源于胚胎植入前的内细胞团（即原肠胚形成之前），而 EGCs 来源于原肠胚形成之后的胚胎原生殖细胞（PGCs）（图 5.1；彩图 11），但不论是前体细胞还是它们衍生出的细胞都是二倍体，都表达 OCT4 和 NANOG [Turnpenny et al.，2006]。在体内环境下，性腺成熟之后 PGCs 完成减数分裂形成单倍体配子，雌性为卵子，雄性为精子，配子融合后产生受精卵，由此开始形成体内大约 200 种左右各种类型的细胞。在实验室培养条件下，PGCs 可以延迟或避免减数分裂，进入快速有丝分裂自我更新的状态，而这一特征正是 EGCs 的标志。小鼠 EGCs 培养技术已很完善 [Matsui et al.，1992；Resnick et al.，1992]，本章介绍的方案适用于人 EGCs 的培养。

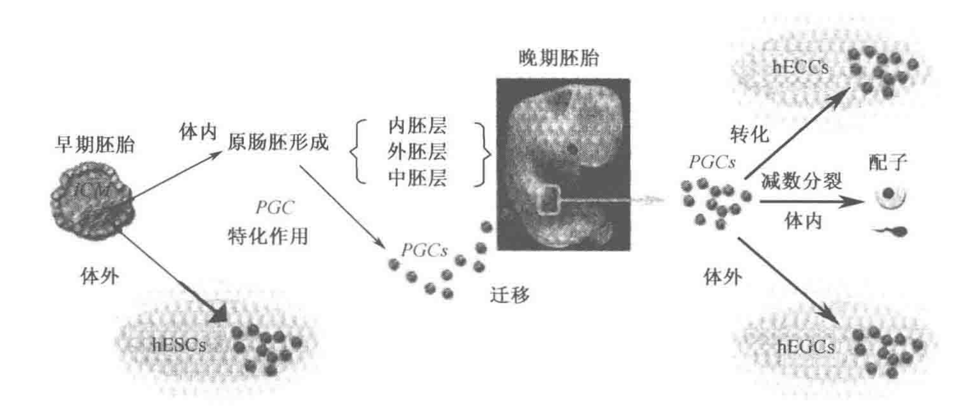


图 5.1　人多能干细胞的来源以及各自的起源细胞（亦见彩版 11）

除了治疗方面的潜能，研究 hEGCs 至少还可延伸至其他三个领域。作为一种潜在的人多能干细胞，hEGCs 提供了一种细胞模型，通过它可以研究人体发育的各个方面，而这是通过其他方法很难做到的。在英国，根据 1990 年制定的人类受精与胚胎学条例，禁止培养 14 天以上的人体胚胎（见第 2 章）。从此期开始一直到可以取材的妊娠社会终止期（也称自愿终止期）大约占妊娠的 7～12 周，我们对此期正常人体的发育过程知之甚少，例如原肠胚的形成过程，此过程产生了外胚层、内胚层、中胚层。与 hESCs 相同，尽管它们的生理环境不完全相同，但 hEGCs 也可提供一个可以模拟这些事件发生过程的实验室模型。

培养 hEGCs 对于更广泛地研究 ESC 还提供了一个比较系统，为了更加全面地了解多能性，鉴别出这两种理论上特性相似的细胞之间的相似性与差异性，可能有助于我们将那些仅仅是由于巧合而产生的特征与那些决定多能性的特征区分开。

研究人 PGC-EGC 谱系的第三个原因是为了深入研究人类性腺肿瘤生物学。人睾丸肿瘤在白种人男性中的发生率为十万分之三至九，在生殖细胞来源肿瘤中其发生频率最高。畸胎瘤（teratocarcinoma）是一种特殊类型的睾丸肿瘤，来源于第三种人多能干细胞，即恶性人胚胎瘤细胞（hECC）（见图 5.1 和彩图 11；见第 6 章）。将 PGC 和 EGC 作为 ECC 未转化的对应细胞来研究，可提供一系列的细胞类型，在这些细胞中我们可分析这两种细胞衍生而来的二倍体生殖细胞谱系，或是异倍体的转化肿瘤细胞。

5.1.2　可选择的策略

迄今为止，只有少数几个研究小组报道了由 hPGC 培养出 hEGCs 细胞系的研究结果 [Aflatoonian and Moore，2005；Park et al.，2004；Shamblott et al.，1998；Turnpenny et al.，2003；Liu et al.，2004]。这些研究结果与背景资料相结合，使我们第一次真正了解了一些 PGC 的生物学特性，而其中一些有意义的重要的内容已经从小鼠胚胎实验中得到推论 [Molyneaux et al.，2001]。在原肠胚形成期，mPGCs 作为一种细胞命运选择的复合物可以从靠近外胚层的子细胞中首先被辨认出来，在性别决定的阶段（睾丸或卵巢），PGCs 从这个位置穿过肠壁迁移到发育中的生殖嵴。在男性，从胚胎发育的第 7 周开始，一些特异性的转录因子的表达使支持细胞分化 [Hanley et al.，1999；2000]，这些细胞群即睾丸素，可诱发生殖细胞停止有丝分裂，与生殖细胞紧密相连。如果没有发生这些事件，卵巢就得到发育，最终，卵巢生殖细胞进入减数分裂的第一期。然而，只有在较长的 PGC 增殖期之后，卵巢细胞的发育过程才出现，所以在胚胎发育的第 8～10 周，发育中的卵巢内生殖细胞的数量较多。

Peter Donovan 和 Brigid Hogan 两个相互独立的研究小组在 1992 年成功地从 PGCs 培养出 mEGCs，这是一个里程碑式的实验 [Matsui et al.，1992；Resnick et al.，1992]，此时距离 Kaufman/Evans 和 Martin 两个研究小组分离培养 mESCs 取得最初的成果 [Kaufman and Evans，1981；Martin，1981] 已经过去了 11 年，花费这么长时间才取得成功，本身就说明尽管培养和分离的程序相似，但要精确确定必要的添加物仍然是很艰难的。这些复杂性另有更加深入的讨论综述 [Turnpenny et al.，2006；Donovan and de Miguel，2003]。无论如何，这些研究已经为 hEGC 的分离培养打下了基础，特别要注意的是，已经证实从胚胎发育的较早期取材，分离培养 mPGCs 得到 EGC 的成功率更高 [McLaren and Durcova-Hills，2001]。这包括在它们到达生殖腺之前进行生殖细胞的培养。与此相比，人体材料可取的时间是在妊娠前三个月的末期，这意味着所有报道从 mPGCs 分离培养得到 EGC 的研究小组，要探索的问题都集中在如何从晚期胚胎（一直到受孕之后 56 天）或早期胎儿分离生殖嵴。Harry Moore 以及 Sheffield 大学的同事们提出了一个有意思的想法，他们已经利用 hESCs 作为研究起始点 [H. Moore，私人通信]，通过设计能够产生生殖细胞谱系的条件，利用那些已经分化的细胞得到 EGC，这种想法（至少从理论上）有可能实现。这种思路提供了一条潜在的可以到达 PGC 发育早期的路径，但这需要提供复杂的实验室模拟条件，模拟生殖细胞谱系正常的体内分化过程。

5.1.3　人胚胎生殖细胞（EGC）研究的现状

已报道利用人妊娠三个月的材料得到 hEGC 培养物的研究小组，所采用的方法基本相同，都是以分离 mEGC 的实验为基础，而分离 mEGC 的方法本身就是利用了 mESC 的培养方法 [Turnpenny et al.，2006]。因此，本章所描述的细节与其他研究小组相比并没有显著的优点。比较重要的一点是：大多数研究小组都遇到了一个难题，即如何在长期培养过程中维持 hEGC 不分化。到目前为止没有一个细胞系保存在公共储存库。事实上初始材料是异质性的，所以能否得到克隆的 hEGC“细胞系”有很大争议。在某种程度上这些困难是预料之中的，因为它们的培养比 hESC 和 hECC 的培养相对容易。不同于 129/sv 小鼠体内畸胎瘤形成的自发性倾向 [Donovan and de Miguel，2003；Stevens，1981]，多发的人睾丸生殖细胞肿瘤是一种精原细胞瘤（seminoma），它缺乏干细胞的成分。此外，通过 11 年的艰苦努力才将 mESC 研究所获得的成功扩展至 mEGC 并获得同样的成果，而且一旦获得成功 mEGCs 的多能性已无可置疑了。因此，对 hEGC 的一般性研究能够达到这个时段的某个水平似乎也是可以接受的，人们期待着那些有助于维持长时间培养物的关键性因子被发现，本章内容和方法学可以促进这些因子的鉴别。

5.2　培养基及试剂配制细则

5.2.1　性腺细胞解离培养基（CDM）

(i) Hank's 平衡盐溶液（HBSS）
(ii) Ⅳ胶原酶，2.5mg/ml
(iii) DNase I，20U/ml
(iv) 热灭活的新生牛血清，2% *V/V*
(v) $CaCl_2$，0.54mmol/L（60μg/ml）

5.2.2　饲养层细胞培养基（FCM）

(i) DMEM
(ii) 胎牛血清（FBS），2% *V/V*
(iii) 青霉素，100U/ml
(iv) 链霉素，100μg/ml

5.2.3　生殖细胞培养基（GCM）

去血清 DMEM 含有：
(i) 去血清替代物（KO-SR），或 ESC 测试胎牛血清（ESC-FBS）…… 15% *V/V*
(ii) L-谷氨酰胺 …… 1mmol/l
(iii) 2-巯基乙醇 …… 0.1mmol/l
(iv) 非必需氨基酸 100× …… 1% *V/V*
(v) 青霉素 …… 100U/ml

(vi) 链霉素 …… 100μg/ml

(vii) 其他添加物(取决于需求的确切证据):

a. Forskolin …… 10μmol/l

b. 重组人 FGF-2 …… 4ng/ml

c. 重组人 LIF …… 1000U/ml

5.2.4 饲养层细胞冻存培养基(FFDM)

(i) DMEM …… 40%

(ii) 胎牛血清(FBS) …… 50%

(iii) 二甲基亚砜(DMSO) …… 10%

5.2.5 生殖细胞冻存培养基(GFDM)

(i) 去血清 DMEM …… 40%

(ii) 去除血清替代物(KO-SR),或 ESC-FBS …… 50%

(iii) DMSO …… 10%

5.2.6 核型分析

低渗溶液:54mmol/L(4g/L)的 KCl 与 27mmol/L(8g/L)的柠檬酸钠 1∶1 混合,或 76mmol/L(5.6g/L)的 KCl(4℃保存不要超过 3 周)。

5.2.7 碱性磷酸酶测定缓冲液

(i) Tris-HCl(pH9.5) …… 100mmol/L

(ii) 氯化镁($MgCl_2$) …… 50mmol/L

(iii) 氯化钠(NaCl) …… 100mmol/L

5.3 细胞培养方法学

所有培养都是在 5%CO_2、95%湿度、37℃条件下进行,操作在层流罩内进行(Ⅱ级微生物安全柜),我们用 75%乙醇清洁表面、管道和器具,所有细胞培养塑料器皿都是无菌的。

5.3.1 饲养层细胞培养

多种类型的小鼠、人胚胎细胞已被证实具有支持 PGCs 生长、促进 hEGCs 衍生的作用。然而在实验中,我们还是发现了一种饲养细胞系——STO 成纤维细胞具有显著的促进作用,其他学者也有同样的发现 [Shamblott et al., 1998; 2004]。下列方案就是使用这种细胞。STO 是永生化的 SIM(Sandoz Inbred mice)胚胎成纤维细胞系,这种细胞可以表达鼠科动物细胞膜结合的干细胞生长因子,在体内及体外这种因子都是生殖细胞的鉴别性因子 [Turnpenny et al., 2006]。然而,与任何一种无限细胞系一样,STO 细胞的特性随着培养时间的延长,亚系之间会发生变化。因此,为了保持一致,

从一个冷冻管来源的细胞经过有限次数的传代之后，最好要制备一批生长停滞的细胞冻存物保存起来。这样的细胞来源也可从供应商获得，例如 ATCC-LGC Promochen 合资企业或欧洲细胞培养物保藏中心（ECACC）。如果出现对 PGCs 生长的支持作用下降，这批细胞就应该放弃，重新制备新的细胞。

方案 5.1 饲养层细胞的制备及培养

试剂与材料

无菌的或无菌制备

☐ STO 成纤维细胞（ATCC CRL-1503；ECACC）
☐ 饲养层细胞培养基（FCM；见 5.2.2 节）
☐ 饲养层细胞冻存培养基
☐ PBSA
☐ 胰蛋白酶，0.25%，EDTA，1mmol/L，溶解于 PBSA
☐ 培养瓶，$75cm^2$ 或 $150cm^2$
☐ 无菌的锥底离心管，15ml 或 50ml

步骤

(a) 从液氮罐中复苏一管 STO 成纤维细胞，局部浸泡在 37℃ 水浴中促进其快速溶解。

(b) 当 90% 细胞悬液溶解时，将冷冻管转移至细胞培养超净台内，用 75% 乙醇清洁冷冻管的表面。

(c) 在管中加入预温的 FCM，将细胞悬液转移至一个 15ml 离心管中，内含 6ml 预温的 FCM。

(d) 250g 离心 3min。

(e) 弃上清，用预温的 FCM 重悬细胞团，转移至一个细胞培养瓶（培养体积：$10ml/75cm^2$ 或 $20ml/150cm^2$，放入培养饲养细胞的温箱中。

(f) 定期更换培养基（每两天）。

(g) 当细胞生长至汇合或接近汇合时，吸去培养基，用预温的无菌 PBSA 轻缓清洗。

(h) 传代时将预温的胰蛋白酶-EDTA 加入培养瓶内使细胞脱落，$75cm^2$ 的培养瓶加 3ml，$150cm^2$ 的培养瓶加 6ml，保证整个培养面都被覆盖。不时地轻叩培养瓶，大约 3min 后可见细胞层从瓶壁上脱落（此过程不必将培养瓶放回培养箱中）。

(i) 加入预温的 FCM（每 1ml 胰蛋白酶对应加入 3ml FCM）终止胰蛋白酶的活性，用吸管反复轻轻吹打使残留贴附的细胞脱落下来。

(j) 将细胞悬液转移至无菌的 15ml 或 50ml 离心管中，250g 离心 3min 使细胞沉降。

(k) 用 10ml 温 FCM 重悬细胞沉淀，1∶5 稀释重新接种。

(l) 重复传代步骤，一次应该得到大约 20～30 瓶（$75cm^2$）汇合的 STO 成纤维细胞。

5.3.2 阻断饲养层细胞的生长

用丝裂霉素 C 处理或用离子射线照射均可使细胞停止生长。我们在使用 γ 射线方面取得了较好的经验。我们的实验方案比较辛苦，需要预先计划，具备使用相应仪器设备的条件。然而，可以制备多份备用细胞冻存起来（每 $75cm^2$ 的培养瓶长满后冻存一管），这样就可保证获得均一的单层细胞，而不需要持续不断地制备、细胞计数（如果采用丝裂霉素 C 处理，就必须计数）。方案 5.2 中的细胞数量是有意调高的，因为在照射及细胞冻融过程中细胞的死亡不可避免。总之，根据我们的经验，此方案节省时间、节省耗材，又可提供稳定的单层 STO 成纤维饲养细胞。

方案 5.2 饲养层细胞的生长阻断

试剂与材料

无菌的

☐ 生长中的 STO 成纤维细胞（见方案 5.1）
☐ 饲养层细胞培养基（FCM；见 5.2.2 节）
☐ 饲养层细胞冻存培养基（FFDM；见 5.2.4 节）
☐ PBSA
☐ 胰蛋白酶，0.25%，EDTA，1mmol/L，溶解于 PBSA
☐ 培养瓶，$75cm^2$ 或 $150cm^2$
☐ 锥底离心管，50ml，无菌
☐ 冷冻管
☐ γ 射线源（例如 ^{137}Cs）
☐ 含有 250ml 异丙醇的可控速率冷冻容器

步骤

(a) 必须在细胞生长至汇合时（每个 $75cm^2$ 培养瓶约有 8×10^6 个细胞）进行辐射处理，我们的经验是：过了这个点最好就不要进行细胞的处理。

(b) 照射前的晚上更换培养基。

(c) 吸去培养基，用预温的无菌 PBSA 轻轻清洗细胞。

(d) 将预温的胰蛋白酶-EDTA 加入培养瓶内使细胞脱落，$75cm^2$ 的培养瓶加 3ml，$150cm^2$ 的培养瓶加 6ml，保证整个培养面都被覆盖。不时地轻叩培养瓶，大约 3min 后可见细胞层从瓶壁上脱落（此过程不必将培养瓶放回培养箱中）。

(e) 加入预温的 FCM（每 1ml 胰蛋白酶对应加入 3ml FCM）终止胰蛋白酶的活性，用吸管反复轻轻吹打使残留贴附的细胞脱落下来。

(f) 将细胞悬液转移至无菌的 50ml 离心管中（为了便于操作，每管内的液体体积最好不要超过 30ml），250*g* 离心 3min 使细胞沉降。

(g) 用 10ml 温 FCM 重悬细胞沉淀，将离心管密封。

(h) 用 50Gy 的 γ 射线照射，使重悬的 STO 细胞失去有丝分裂活性（我们使用的是 37-MBq ^{137}Cs 放射源照射 23min 达到此剂量），此剂量适合于处于这种质量及密度的 STO 细胞，不同的细胞系或不同的细胞数量可能需要调整照射的时间。

(i) 250*g* 离心 3min 使细胞沉降。

(j) 用预温的 FFDM 充分重悬细胞，每个 75cm^2 培养瓶培养的细胞用 1ml 的冻存液。

(k) 保持均匀的细胞悬液，按 1ml 的量分装至各冷冻管中，放在可控速率冷冻容器内置于－80℃过夜。

(l) 次日晨，将冷冻管转移至液氮罐中。

5.3.3　接种单层饲养层细胞

为了进行实验室研究，要获得具备一定质量并且处于特殊时间段内的人体临床材料，而使用人体临床材料往往不能像使用动物模型那样可预先计划。最好是在开始进行人生殖细胞培养的前一天接种阻断生长的单层成纤维细胞饲养层，但如果再早一天接种，饲养细胞仍然可用。当临时得到实验材料进行取材时，我们发现饲养细胞可以在 5h 内成功地附着在培养表面，这其中一部分原因是由于接种饲养细胞的培养基与接种生殖细胞的培养基不同：FCM 含有血清，血清中含有促进细胞黏附于培养器皿表面的因子，而 GCM 中的去除血清替代物（KO-SR，见 5.7 节）不含这些“黏附因子”。

建立生殖细胞培养常有一些不能确定的因素（见 5.3.4 节），细胞开始明显生长可能需要一周以上的时间，而饲养层细胞能够存活的平均时间大约为 10 天，这就是为什么在进行生殖细胞培养前预先接种饲养层细胞不能超过两天。还有，在组织取材的当天早晨将 FCM 转换成 GCM，这段时间可以使 GCM 被饲养层细胞释放的因子所同化。

方案 5.2 中提到，经过辐射处理的饲养细胞在冷冻时是按照每个 75cm^2 的培养瓶长满汇合时的细胞冻存一管的比例进行，这个细胞数量能够接种的表面积大约相当于一个直径 10cm 的培养皿。因此一个冷冻管所含的细胞足以在一个直径 10cm 的培养皿中形成单层，或按比例计算，可以接种 3～4 个直径 6cm 的培养皿，8 个直径 3.5cm 的培养皿，或一个 6 孔板，1¾个 12 孔板，1.5 个 24 孔板。同样也可推论至 96 孔板或纤连蛋白预包被的玻片（方案 5.4）。

方案 5.3　接种生长阻断的单层饲养细胞

试剂与材料

无菌的或无菌制备

□ 无分裂活性的 STO 成纤维细胞（见方案 5.2）

☐ 饲养层细胞培养基（FCM；见 5.2.2 节）
☐ 生殖细胞培养基（GCM；见 5.2.3 节）
☐ PBSA
☐ 胰蛋白酶，0.25%，1mmol/L EDTA，溶解于 PBSA
☐ 培养器皿（直径 6 或 3.5cm 的培养皿或 24、12、6 孔培养板）
☐ 锥底离心管，15ml

步骤

(a) 开始进行生殖细胞培养的前一天，从液氮罐中取出一管经辐射处理过的 STO 成纤维细胞，局部浸泡在 37℃水浴中促进其快速溶解。

(b) 当 90%的冷冻物溶解时，将冷冻管转移至细胞培养超净台内，用 75%乙醇清洁冷冻管的表面。

(c) 将细胞悬液转移至一个 15ml 离心管中，内含 6ml 预温的 FCM，短暂轻轻吹打混匀，250*g* 离心 3min。

(d) 用 FCM 重悬细胞，加入的体积为总培养体积的一半；将另一半体积的培养基加至培养皿或培养孔中；将重悬的饲养细胞按比例平均地加至培养皿或培养孔中。小心地将这些培养器皿放在细胞培养箱中。

(e) 次日晨（即取组织的当天），吸去 FCM，用无菌 PBSA 轻轻清洗细胞。

(f) 去除 PBSA，轻轻加入预温的 GCM，达到生殖细胞总培养体积的一半（见方案 5.5）。

(g) 将培养器皿放回培养箱中，直至接种生殖细胞。

我们在塑料组织培养器皿中接种经射线照射过的成纤维细胞饲养层，随后接种人的性腺细胞，同时也可制备用于细胞培养的玻片而后接种细胞，带小室的玻璃培养片适合于随后要进行荧光免疫细胞化学分析细胞类型的实验（方案 5.8）。为了使成纤维细胞有效地贴附，玻片在使用前要用一些细胞外基质的模拟物包被一下。我们发现纤连蛋白是最便宜的，又是最可靠的促贴壁因子，尽管它的原理与其他试剂如层粘连蛋白（laminin）或 Matrigel 没有什么区别。与此类似，也可用明胶包被的培养皿进行 EGC 分化的研究。

方案 5.4　包被带培养小室的玻片或组织培养皿

试剂与材料

无菌的

☐ 明胶，2%无菌溶液
☐ 纤连蛋白（牛；1mg/L）
☐ 带小室的玻片

步骤

(a) 在细胞培养超净台中将带小室的玻片从无菌包装中取出。

(b) 吸取纤连蛋白放在每个小室的中央，5μg/cm²，将吸管中的空气排出形成一个气泡，以此将纤连蛋白涂开覆盖整个孔的表面。

(c) 将带小室的玻片盖好，放入组织培养超净台中干燥，根据我们的经验，制备好的玻片至少可以在4℃存放一周。

(d) 如果要用明胶包被培养皿，可将用无菌水配制的0.1%的明胶工作液涂在培养皿的表面，放置1h，而后吸去液体，将盖子留个小缝，将培养皿放在组织培养超净台中干燥。明胶包被的培养皿至少可以在4℃存放一个月。

5.3.4 人胚胎性腺细胞的原代培养

在英国，使用人胚胎及胎儿材料要执行Polkinghorne委员会在1989年制定的操作指南法规[Polkinghorne，1989]。此外，研究项目需要通过伦理认可，只有与那些准备在妊娠的社会（或自愿）终止期流产的妇女签署了知情同意书之后方可取材。

我们的实验已从大约受孕后7～11周（wpc）的胚胎取出生殖嵴，在解剖镜下用无菌的器械和容器鉴别及解剖。这种操作能使随后的污染风险降至最低。但一定要认识到经阴道获得的材料并非无菌，因此我们要使用专用的培养箱，将人生殖细胞原代培养与其他所有的培养分开。

分离出的生殖嵴放在无菌的HBSS中，转移至超净台内进行细胞分离。我们介绍两种解离方法，这两种方法都是可变化的，大概有一些不可控制的因素，包括：材料所处的不同发育阶段；取材与开始操作之间的时间；可供操作的样品数。最终得到的细胞悬液将含有单个细胞、小的细胞团以及大的未解离的细胞块，细胞块会沉降，用吸管将单个细胞和小的细胞团吸出用于接种。尽管第一种方法可能得到较多的细胞，但使用了蛋白酶使一定比例的细胞溶解，对细胞表面的重要蛋白产生潜在的损伤。与此相反，第二种方法可能得到的细胞数较少，但避免了长时间的清洗、重悬，将潜在的损伤减少到最小。我们发现这两种方法都可有效地应用于最初的hEGC培养，然而到目前为止我们还是不能够确定哪一种方法的产量更高。同样，我们也已确定从生殖嵴中保留或去除中肾得到的培养物没有什么差别。

我们的生殖细胞培养基列于5.2.3节，在我们看来，还不清楚的问题是，在建立和维持生殖细胞培养过程中，添加forskolin、重组人成纤维细胞生长因子2（FGF-2）、重组人白血病抑制因子（LIF）是否有明显的不同。已发表的有关hEGC培养的文献，也包括我们的文章，都添加了这些因子[Shamblott et al.，1998；Turnpenny et al.，2003；Liu et al.，2004；Park et al.，2004]。

方案5.5 人胚胎性腺的解剖解离及细胞接种

试剂与材料

灭菌的或无菌制备的

☐ 预接种的生长阻断的STO成纤维细胞（见方案5.3）
☐ 生殖细胞培养基（GCM；见5.2.3节）

□ Hank's 平衡盐溶液（HBSS）

□ EDTA，二钠盐，0.3mmol/L（0.01%），溶于 PBSA

□ 细胞解离培养基（CDM，见 5.2.1 节）

□ 锥底离心管，15ml

□ 手术刀

□ 针头，18G

□ 用于解剖的玻璃培养皿或玻片

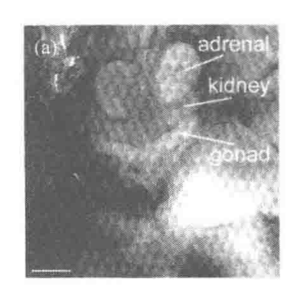
□ 尼龙网，100μm 孔径，根据培养器皿的大小剪裁，高温高压灭菌。

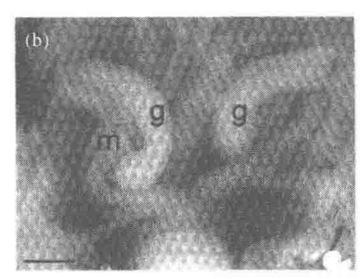
非无菌的

□ 摇床，温度设置在 37℃，速度大约为 200r/min。

步骤

(a) 解剖出性腺（含或不含中肾），置于无菌的 HBSS（见图 5.2）。





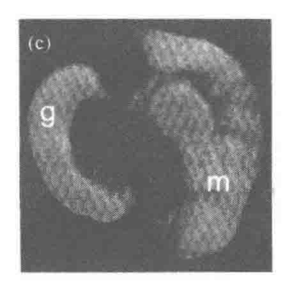


图 5.2　人性腺和中肾的鉴别与解剖

(a) 妊娠 8 周胎儿的腹部观；(b) 性腺（g）与中肾（m）的原位显示；(c) 分离出的性腺与中肾。标尺＝2mm（a），＝1mm（b）。

(b) 任选下列一种方法制备细胞用于接种。

程序 1

①将组织浸泡于 EDTA 溶液 10min，而后放回 HBSS 中。

②在一个无菌的玻璃培养皿（或玻片）上，用无菌的手术刀和镊子将组织以机械法解离，组织要保持在少量 HBSS 中，避免干涸。

③将材料转移至 15ml 锥底离心管中，内含 2ml 细胞解离液（CDM），在摇床上 37℃摇 1～2h，用带有 18G 针头的注射器随机研磨。

④250*g* 离心，3min。

⑤小心吸弃上清，随意清洗。如果不做这一步，第四步离心后得到的沉淀可以直接重悬（步骤 7）。

⑥加入 3ml HBSS，用吸管吹打，轻缓地重悬细胞团，而后再次 250*g* 离心，3min，小心吸弃上清。

⑦用预温的 GCM 重悬细胞团（体积为总培养体积的一半，参考方案 5.3，步骤 7），放置 3～5min。

程序 2

①将组织浸泡于 EDTA 溶液 20min，而后放回 HBSS 中。

②将组织放入一个无菌的玻璃培养皿内，加少量预温的 GCM。

③在解剖镜下用无菌的解剖针和镊子刺破挤压整个器官，使细胞直接释放到培养基中。

④将培养基转移至一个 15ml 尖底离心管中，内含有预温的 GCM [保持整个培养体积的一半，可参考前述方案 5.3 中的步骤（f）]，将细胞悬液放置 3～5min。

（c）用吸管收集上清中的单个细胞或小的成团的细胞来接种，或者也可选择用无菌的、孔径 100μm 的尼龙网过滤细胞悬液（将网的下面浸入培养基中湿润，将悬液加在网的上面）。

（d）轻缓地将细胞从一边到另一边递次地分配至选好的皿或多孔板中，这些皿或板都预先接种了饲养层细胞，用吸管将细胞直接加至培养基中。

（e）将培养器皿放入一个专用的 CO_2 温箱中。

5.3.5　性腺来源细胞培养物的维持

我们的经验是在所有分离性腺来源细胞的原代培养中都要加抗生素，至少是在使用非无菌来源的初始材料时应该使用，但没有必要使用抗真菌的试剂。然而支原体的感染随时存在，因此初始培养与维持培养都要放在一个专用的培养箱中。一旦培养建立，就要进行支原体的常规检测，作为证据，同时还要进行核型特性分析（见方案 5.9）。我们采用过多种商品化的可行方法，没有什么特别的改进。

方案 5.6　性腺细胞培养物的维持与传代

试剂与材料

无菌材料

- □ 生殖细胞培养基（GCM；见 5.2.3 节）
- □ 无菌的 PBSA
- □ 胰蛋白酶，0.25%，EDTA，1mmol/L，溶于 PBSA
- □ 预接种的不分裂的 STO 成纤维细胞（见方案 5.3）
- □ 饲养层细胞培养基（FCM，见 5.2.3 节）
- □ 细胞培养瓶（直径 6cm 或 3cm 的培养皿或 24、12、6 孔板）
- □ 锥底离心管，15ml

步骤

（a）培养的第 3 天，从温箱中取出培养物，根据培养基的混浊程度决定采用下列方案中的一种。

（i）如果培养物已经污染死亡，将其丢弃。

（ii）如果培养基混浊是由于存在大量死细胞残渣，将培养基全部更换。

（iii）如果培养基适度清澈，更换一半培养基。

(b) 小心吸去培养基（完全或部分），轻轻地加入新鲜的预温的 GCM。

(c) 此后每天重复步骤 (a) 和 (b)。

(d) 培养的第 2 周，鉴定评价培养物（见方案 5.4），将所选择的培养物按以下步骤进行第一次传代。

(e) 小心地吸去培养基，用预温的无菌的 PBSA 轻轻清洗细胞。

(f) 加入最小体积的、预温的胰蛋白酶-EDTA，只要覆盖细胞生长表面即可（如，直径 6cm 的培养皿加 1ml），将培养器皿放回温箱。

(g) 大约 3min 后，将培养皿放在显微镜下观察，看细胞是否脱离瓶壁，一旦细胞开始脱落，就不要长时间地将细胞浸泡在胰蛋白酶溶液中。

(h) 加入 5ml 预温的 GCM 至培养器皿中，使胰蛋白酶失活，轻轻吹打收集残留的贴壁细胞，如果需要，可以用吸头或无菌的细胞刮轻轻刮取贴壁较牢固的集落。如果只使用了少量胰蛋白酶，也可选择这样操作：加入 GCM 使胰蛋白酶失活，体积为随后需要使用的培养基总量的一半，而不是前述的 5ml，这样操作后就进入步骤 (l)。

(i) 将细胞转移（尽量收集）至 15ml 锥底离心管中。

(j) 250*g* 离心 3min，吸弃上清。

(k) 用随后需要使用的培养基总量的一半，将细胞团轻轻地重新悬浮起来。

(l) 从温箱中取出预接种了饲养细胞的培养器皿，轻轻将细胞放入选择好的培养皿或培养板中（要逐滴加入，这样可尽量避免损伤细胞），要避免损伤饲养细胞层，将培养器皿放回培养箱中。

(m) 下次传代再从步骤 (a) 开始操作。

5.4 培养物鉴定与特性分析

5.4.1 区分生殖细胞培养物的状态

在我们的实验以及其他学者的实验中，人生殖细胞培养面临的主要障碍之一是很难在光学显微镜下通过观察集落的形态来可靠地评价培养物的状态（图 5.2，彩图 5），尽管集落可见，但不是所有都位于饲养细胞的上层，有些是在成纤维细胞之间的空间形成巢状，此处可能有经辐射处理后的细胞所分泌的细胞外基质。另一方面，只有固定及测试之后才能确认组成集落的细胞是否为碱性磷酸酶（AP）阳性。这与我们所做的 hESCs 或 hECCs 培养不同，它们的集落形态具有较大的预见性（见图 5.3）。为了解决这个问题，我们通常在原代培养时及传代培养时使用多孔板，这样可以随时牺牲一些孔用于鉴定生殖细胞评价它们的生长，而不会搅乱大部分培养物的生长。同样，在传代时重悬细胞的样品也可取出用于附加的特性分析（见 5.4.2 节）。这些步骤已经能够使我们很快地预测出哪些培养物应该采取措施，付出努力。在最初 2 周内（通常是在第一次传代时），我们要评价培养物的生长特性、形态，以及最关键的指标：是否含有碱性磷酸酶活性的细胞（见方案 5.7）。根据这些标准，培养物可以分为两种类型："PP"（弱增殖型）或 "VP"（强增殖型），我们将 "VP" 细胞作为 hEGC 状态的特征，并且在先前已报道，大约 15%的原代培养物经过此步骤被证实具有衍生效力 [Turnpenny et al., 2003]。

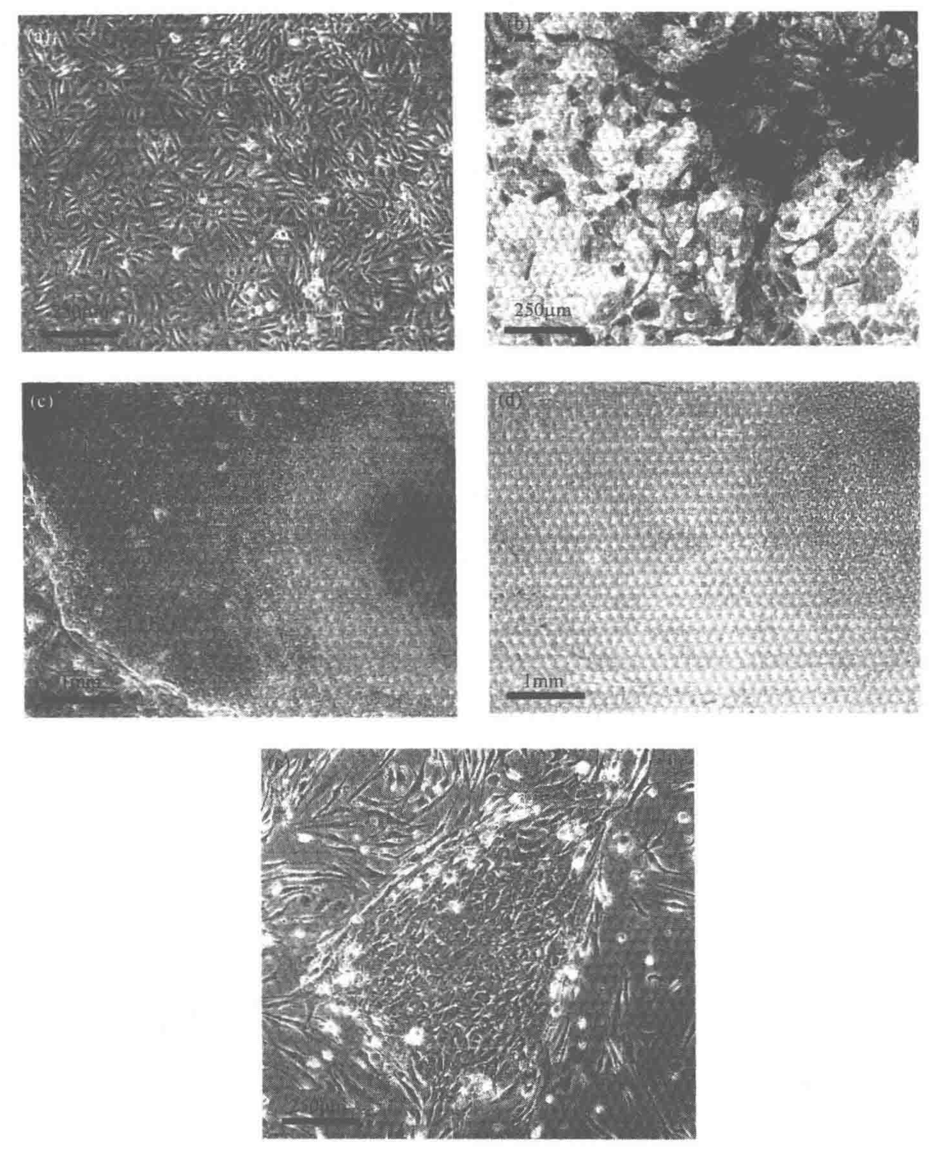


图 5.3　集落形态学，集落形态不一定能确定碱性磷酸酶（AP）的染色情况。(a) 用亮视野观察难以区分单个集落。(b) a 中的细胞经过一系列 AP 染色显示含有生殖细胞，与此相反，图 c 中的集落很容易看清，但关键性的 AP 染色为阴性 (d)。(e) hESCs 的特征性集落形态（这样的集落总能显示具有 AP 活性）(亦见彩图 5)

5.4.1.1　弱增殖型培养物——“PP”

已证明这些培养物中只含有有限的生殖细胞，AP 染色显示只有个别细胞或很小一堆细胞是阳性，集落形成率很低（图 5.4）。用固定的细胞进行多能标记物的免疫细胞化学染色，也得到类似的结果。有意思的是，这些细胞可存活 50 天或更长时间，尽管持续添加各种因子（如 FGF-2）、试用不同组合的培养基配方以及各种有利于培养物的

表面物质，但要使其转变为增殖型非常困难。

5.4.1.2　强增殖型培养物——“VP”

这些培养物形成各种形态的多样化集落或增殖性“迁移样”细胞网络，它们生长在休止期的饲养细胞层上。AP 强阳性的细胞占很高比例（大于 90%）（见图 5.4）。在传代过程中，集落生长和网络增殖持续存在，AP 表达以及多能细胞的其他标志物（见方案 5.7、5.8）的免疫反应活性也一直保持。与单个集落相比，VP 培养物中的网络细胞与体内迁移型 PGCs 的增殖能力惊人的相似。

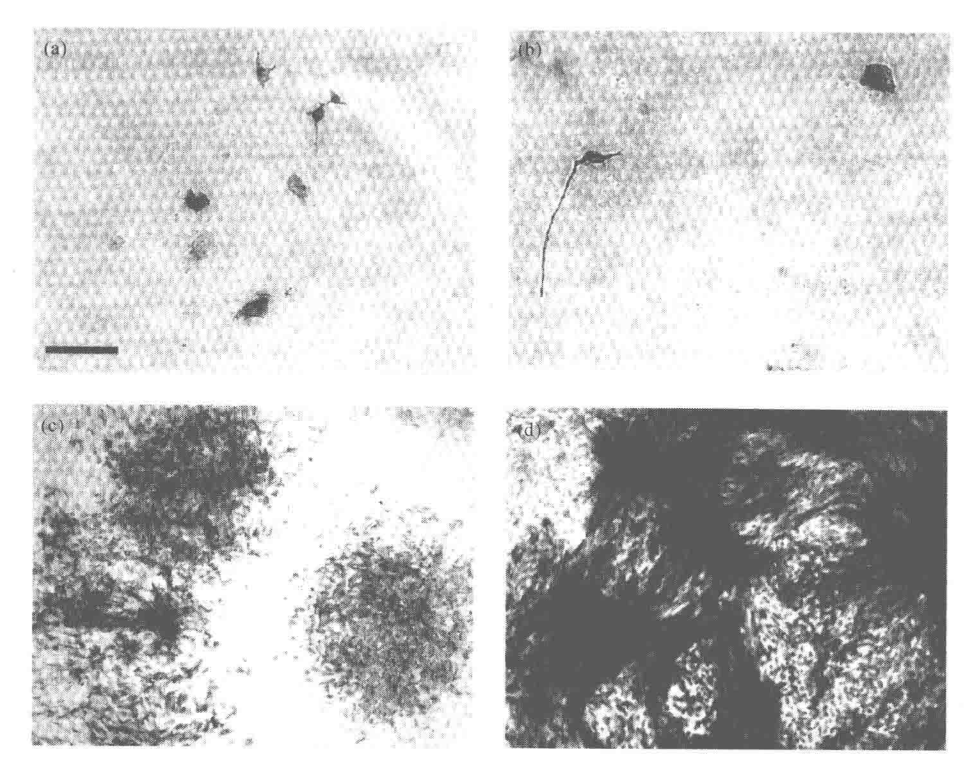


图 5.4　弱增殖型和强增殖型人生殖细胞培养物（a 和 b）：含有生殖细胞的弱增殖型培养物示例，显示先前描述过的两种形态：“静止型”和“迁移型”[Shamblott，et al]。（c 和 d）强增殖型培养物示例。有些是松散聚集的集落（c），有些则更似细胞网络（d）。标尺 $=100\mu m$（a，b），$=1mm$（c，d）

如果 VP 状态提示处于 PGC 向 EGC 的转变阶段，那与此相反，PP 培养物则表明未能进入这种状态。由于 PP 细胞始终存在，因此这些发现便说明，细胞的存活以及支持它的培养条件对于 EGC 细胞的不很明确的“转变”（conversion）或“衍生”（derivation）并不起什么作用。到目前为止，对于决定 hEGCs 转化的因子还知之甚少。

5.4.2　人生殖细胞培养物的特性分析

培养过程中对人生殖细胞的特性分析可取对照材料同时进行，对照材料可用来源于性腺初始材料的固定的组织切片或 RNA 提取物，也可用 hESCs 或 hECCs 培养物。我

们通过检测几个关键性的标志物，例如 OCTs、SSEAs 以及 hTERT，就可以确认 VP 培养物中 hEGCs 的自我更新性。同样，这种基因表达谱的缺失伴随着分化标记物的出现，通过采集转录物和蛋白就可以鉴别来自外胚层、内胚层、中胚层的细胞谱系。这些鉴定方法可以满足在体外进行多能性鉴定的要求，也已经被所有从事 hEGCS 培养的研究小组所采纳［Shamblott et al.，1998；Turnpenny et al.，2003；Liu et al.，2004；Park et al.，2004］。

5.4.2.1 碱性磷酸酶活性染色

检测碱性磷酸酶活性是监测人生殖腺培养物中生殖细胞谱系的一种可靠、易行、快速的手段。除了方案 5.7 中所特别列出的试剂之外，不同的商品化试剂都可使用。

方案 5.7 生殖细胞培养物的固定与碱性磷酸酶染色

试剂与材料

非无菌材料

☐ PBSA
☐ 多聚甲醛（PFA），4%，*W/V*
☐ 乙醇：50%，70%，100%，*V/V*
☐ 测定缓冲液（见 5.2.7 节）
☐ 氯化硝基四氮唑蓝（Nitro-blue tetrazolium chloride，NBT），100mg/ml
☐ 5-溴-4-氯-3′-吲哚磷酸 p-对甲苯胺（BCIP），50mg/ml
☐ Aquamount
☐ 去离子水

步骤

(a) 从培养器皿中吸去培养基，用 PBSA 轻轻清洗贴壁细胞。

(b) 吸去 PBSA，加入用 PBSA 配制的 4%PFA，固定 3min。

(c) 吸去固定液，再用 PBSA 洗。如果样品要储存起来，就按步骤（d）和（e）操作。如果要马上继续操作，就要用检测缓冲液短暂地平衡一下，而后直接按步骤（g）操作。

(d) 去除 PBSA，通过不断增加乙醇的浓度使细胞脱水：50%、70%、100%，每一步 2min。

(e) 使培养器皿和固定的细胞在室温下干燥，而后储存于 4℃。

(f) 在培养物的表面加上检测缓冲液孵育 2min，使细胞恢复水分。

(g) 吸去检测缓冲液，加入含有 4.5μg/ml NBT 和 BCIP 的显色底物，加入的量为可覆盖细胞表面。

(h) 室温孵育 2h，避光。

(i) 如果是阳性，颜色反应肉眼可见，用去离子水洗细胞，5min。加一些封片剂

（如 Aquamount）用玻璃盖玻片封片。

(j) 用显微镜观察细胞。

5.4.2.2　免疫细胞化学分析

除了检测 AP 活性，免疫细胞化学（ICC）也可用于鉴别多能干细胞标志物。许多生物技术公司出售大量抗体用于干细胞研究，我们常用的一些抗体列于表 5.1。检测可用荧光，也可用亮视野显微镜观察可见的颜色沉淀反应。采用荧光 ICC，要求使用玻片观察，而不能使用塑料的组织培养器皿，一种简易的方法是在进行培养时将培养物接种在包被有纤连蛋白的玻片上（方案 5.4）。

表 5.1　可用于鉴别多能干细胞标志物的一抗

名称	种属	公司	货号	工作浓度
NANOG	羊多克隆抗体	R&D Systems	AF1887	1∶20
OCT4	羊多克隆抗体	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Sc-8629	1∶150
SSEA1	小鼠单克隆抗体	DSHB	MC-480	1∶20
SSEA3	大鼠单克隆抗体	DSHB	MC-631	1∶20
SSEA4	小鼠单克隆抗体	DSHB	MC-813-70	1∶20
PCG 表面标志	小鼠单克隆抗体	DSHB	EMA-1	1∶20
hTERT	小鼠单克隆抗体	Novocastra	MCL-L-hTERT	1∶50
TRA-1-60	小鼠单克隆抗体	Chemicon Ltd.	MAB4360	1∶50
TRA-1-81	小鼠单克隆抗体	Chemicon Ltd.	MAB4381	1∶50

直接以刚结束培养的细胞为材料（此时细胞仍然是湿的），或以脱水储存的样品（用 PBSA 处理使其恢复水分）为材料，均可采用方案 5.8 进行操作。

方案 5.8　固定后生殖细胞培养物的免疫细胞化学分析

试剂与材料

非无菌材料

- ☐ PBSA
- ☐ 固定液，如：PBSA 配制的 4% PFA，或水配制的 40%（*V*/*V*）甲醇、40%（*V*/*V*）丙酮
- ☐ 胰蛋白酶，0.25%，1mmol/L EDTA，溶于 PBSA
- ☐ 一抗（见表 5.1）
- ☐ 用生物素或荧光素标记的、针对一抗的二抗
- ☐ 柠檬酸钠（pH6.0），10mmol/L 或 1%（*V*/*V*）Triton X-100
- ☐ 甲苯胺蓝（Toluidine Blue）
- ☐ DAPI

步骤

(a) 吸去培养基，用 PBSA 轻轻清洗细胞。

(b) 加入固定液（根据实验所用的一抗来选择不同的固定液）固定 3min。

(c) 用 PBSA 轻轻清洗细胞，同方案 5.7，细胞可用乙醇脱水而后储存起来，或直接进行 ICC [步骤 (d)]。如果是脱水后的细胞，在步骤 (d) 后必须用 PBSA 处理 5min 以恢复水分。

(d) 在集落周围或在感兴趣的区域用石蜡画一个圈可以阻止液体的流动，商品化的蜡笔或指甲油也是可用的。

(e) 可渗透性处理取决于一抗的需要和组织培养表面的性质，如果使用的是玻片，可将其浸泡在沸腾的柠檬酸钠溶液中，但如果使用的是塑料培养器皿就不合适，这种情况可将样品用 1% Triton X-100 处理 20min。根据我们的经验（可能是），使用表 5.1 所列的各种转录因子的抗体，就将样品在沸腾的柠檬酸钠溶液中处理大约 5min 是有好处的，使用其他抗体则不需要特别的“暴露”处理。

(f) 吸去增加通透性的溶液，用 PBSA 洗细胞。

(g) 吸去 PBSA，采用标准的 ICC 操作程序或抗体供应商提供的操作程序进行操作。

(h) 使用何种复染试剂显示细胞核，取决于采用亮视野 ICC 或是采用荧光 ICC，前者使用甲苯胺蓝，后者使用 DAPI。同样，使用何种封片剂，取决于使用的是玻片还是塑料器皿。

5.4.2.3　培养物的 RT-PCR 分析

对人生殖细胞培养物进行鉴别分析时，RT-PCR 是对免疫细胞化学分析的一个有力的辅助。我们将细胞样品常规储存于 Qiagen's “RNA Later”，利用常用的商业试剂提取总 RNA 用于 cDNA 合成及 PCR。

5.4.2.4　人生殖细胞培养物的核型分析

研究人干细胞的强大动力来自于将来在疾病治疗方面具有巨大的潜力，这也使得干细胞的染色体稳定性非常重要。研究中期染色体的结构可以了解染色体结构直至数个兆碱基的变化，对于有经验的细胞遗传学家来说，如果结合 Giemsa 染色、特征性的 G-带图谱，可以得到更多染色体完整性方面的信息。从 hESC 培养物已经得到多张图谱，显示染色体断裂、不稳定的高亮度区域 [Draper et al]，hESC 比 hEGC 维持时间长，传代次数高许多，到目前为止还没有 hEGC 在这方面的报道，这可能是由于维持这些培养物在经受冻-溶之后仍然存活是件困难的事，不能达到足够多的传代次数。

方案5.9　用生殖细胞培养物制备中期分裂相

试剂与材料

无菌材料

□ 秋水仙胺（KaryoMAX）

□ 胰蛋白酶，0.25%，EDTA，1mmol/L，溶于PBSA

非无菌材料

□ 低渗溶液（见5.2.6节）

□ 固定液：甲醇∶冰醋酸为3∶1（V/V）

□ DAPI：4′,6-二脒基-2-苯基吲哚，5μg/ml

□ 玻片

特殊的仪器设备

□ 荧光显微镜

步骤

(a) 使VP培养物生长，长满一个$75cm^2$培养瓶或相当于这个量的其他器皿，在进行步骤（b）的前一天更换新的培养基。

(b) 加入100μl秋水仙胺（每10ml培养基），孵育15～20min。

(c) 用胰蛋白酶消化使细胞脱落，离心收集细胞，按照方案5.6操作。

(d) 加几滴低渗溶液小心悬浮沉淀的细胞，用塑料的Pasteur吸管轻轻加入1ml，继续轻轻悬浮细胞，最终加至体积约8ml，轻轻地反复混匀细胞，置37℃孵育15～20min。

(e) 慢慢地逐滴加入0.5ml固定液，沿着试管壁滴加，避免损伤这些易破的细胞。上下吹打20次，还是沿着试管壁。加入更多的固定液至总体积10ml，反复吹打产生气泡。

(f) 250*g* 离心5min。

(g) 用5ml的固定液重悬细胞，4℃放置至少30min。如果需要，细胞可在这种状态下存放几天。

(h) 250*g* 离心5min，用2ml固定液重悬细胞。

(i) 将未处理、未包被过的玻片浸泡在固定液中30min，用纸巾擦干玻片。

(j) 以固定液预湿玻片，用玻璃吸管将细胞与固定液混合，在准备好的玻片上滴几滴，将玻片倾斜使液体流下来，片子在空气中干燥，剩余的细胞悬液可储存于－20℃。

(k) 在玻片上加一滴含有DAPI染料的封片剂，放一块玻璃盖玻片，在盖玻片的边缘用指甲油封闭，置荧光显微镜下观察。DAPI与DNA结合时在波长460nm发光。

(l) 染好的片子可在4℃避光储存，步骤（j）制备出的干燥、未染色的片子可在室温存放大约两周，也可将片子放在一个密封的有干燥剂的盒子中，保存于－20℃。

但是，如果实验推迟，最好还是用步骤（j）得到的细胞悬液制备新的片子，不要依赖于长期储存在－20℃的片子。

5.5 人生殖细胞培养物的分化

5.5.1 体外实验评价多能性

我们的实验已经证实，尽管有严格的影响去向的维持条件，VP 生殖细胞/hEGCs 在培养过程中仍具有明显的自发分化倾向。大部分报道过人生殖细胞培养的研究小组也间接提到这些困难 [Turnpenny et al., 2003; Liu et al., 2004; Onyango et al., 2002]。然而，在它们的增殖早期，未分化的标记物为阳性时，VP 培养物为在体外证实多能性提供了材料。我们的实验已经可以促进细胞的聚集，不论是采用汇合之后一直维持生长的方法，还是采用悬浮培养的方法。已有报道，不加 LIF、FGF-2 和 forskolin，失去饲养层细胞的影响，能够促进分化，结果产生与来源于 hESC 培养物的胚胎小体（EBs）类似的结构（见第 2 章）。与我们先前对培养物形态的解释相同，这个方案对于 PP 培养物是行不通的，而对于 VP 生殖细胞培养物，则很容易产生多样的、清楚的 EB 样结构（gcEBs，"gc" 代表起源于生殖细胞）。然而，与 ESC 分化不同的是，没有观察到自发性的收缩，这与发生中胚层分化产生心肌细胞的倾向性很小是一致的。但是我们和其他研究小组都已经观察到神经分化的倾向，证据是神经突起向外生长 [Turnpenny et al., 2005]。

gcEBs 一旦形成，就不需要在有利分化的条件下培养 [Shamblott et al., 2001]，例如不需要在 96 孔板中加入各种分化生长因子。在平底的组织培养塑料器皿中，gcEBs 趋向于附着，细胞向外生长。在未处理的圆底 96 孔板中，可维持不附着的 gcEBs 结构，可通过免疫组织化学以及 RT-PCR 进行特性分析。AP 活性进行性、持久性地丧失可以作为多能性逐渐下降的证据：对早期培养的 gcEBs（小于 2 天）进行 AP 染色，可以看到未分化细胞类型的聚集，当 gcEBs "成熟" 时，这种现象就减少了。

方案 5.10　胚胎生殖细胞的体外促进分化

试剂与材料

无菌材料

- ☐ 胰蛋白酶，0.25%，1mmol/L EDTA，溶于 PBSA
- ☐ PBSA
- ☐ 氯化钙（$CaCl_2$），1 mol/L，用无菌超纯水配制
- ☐ 明胶包被的培养器皿（见方案 5.4）
- ☐ 培养皿，非组织培养级别
- ☐ 细胞培养器皿（直径 6 或 3.5cm 的培养皿或 24、12、6 孔板）

步骤

(a) 重悬来自 VP 培养物的细胞，按传代步骤进行（见方案 5.6），但接种于不含

LIF、FGF-2、forskolin 的 GCM 中。

(b) 下列方法都可促进细胞的聚集：

程序 1

(i) 加入 $CaCl_2$ 至终浓度 4.5mmol/L。

(ii) 将细胞悬液转移至一个未处理的无菌培养皿中。

(iii) 培养几天使细胞聚集，每两天部分更换培养基。

程序 2

(i) 将细胞悬液转移至明胶包被的组织培养器皿中（方案 5.4）

(ii) 使培养物生长至汇合之后，每两天更换一次培养基。

(c) 收集发育的 gcEBs 放在未处理的圆底 96 孔板中继续单独培养。

(d) 每两天更换一次培养。我们已经得到了维持 2～21 天的 gcEBs 培养物。

由于 gcEBs 很小（直径大约 1～3mm），所以很难取，为了易于进行免疫组织化学分析鉴定其特性，可将 gcEBs 包埋在一滴琼脂糖中，而后再进行石蜡包埋、切片、展片，用于标准的免疫组织化学研究。

方案 5.11　生殖细胞胚胎小体结构的证实

试剂与材料

非无菌材料

- □ 低熔点（LMP）琼脂糖
- □ PBSA
- □ 固定液：PFA，4%（W/V），或甲醇：冰醋酸为 3∶1
- □ 热块
- □ 乙醇，70%，80%，90%，100%（V/V），用去离子水配制
- □ 氯仿
- □ 石蜡
- □ 真空干燥箱

步骤

(a) 用 PBSA 溶解 LMP 琼脂糖于试管中，1.5%（W/V），将试管放在 37℃ 水浴中。

(b) 将培养皿放在 50℃ 热块上，在培养皿内滴一小滴溶解的琼脂糖（防止琼脂糖凝固）。

(c) 从培养物中取出单个 gcEBs，用温的 PBSA 冲洗。

(d) 用吸管小心地将 gcEBs 置于琼脂糖滴中，将培养皿从热块上移开，使其冷却。

(e) 将凝固的琼脂糖-gcEBs 浸泡于固定液中（两种固定液任选），不要超过 2h。

(f) 用梯度酒精脱水：70%、80%、90%、100%，每级浓度放置 2h。

(g) 用三氯甲烷浸泡 2h 以置换乙醇。

(h) 按照包埋的标准程序将组织转入熔化的石蜡中。

5.5.2 体内实验评价多能性

多能性的最可靠测试方法是将干细胞注射至囊胚中，观察其参与形成嵌合胚胎的能力。出于伦理的考虑，这种方法不允许用于人干细胞的研究，取而代之的体内评价试验，是观察畸胎瘤在免疫妥协小鼠（参见第7章）体内的形成情况。这些肿瘤被认为是干细胞组分在良性增殖过程中伴随着子细胞的分化衍生出整个三个胚层。尽管有两个报道过hEGC的研究小组试图这样做，但还未见hEGC形成畸胎瘤的文章发表。也许这同样是由于体外维持不分化细胞的困难性所致，因为这导致在体内没有充足的干细胞得以形成畸胎瘤的分化结构。这些研究结果与那些用内细胞团、小鼠或人来源的ESCs和ECCs、mEGCs，以及最近刚分离的小鼠种系细胞所得到的研究结果不同，后述的所有细胞都可以在植入体内时形成畸胎瘤，而hEGCs的行为更像小鼠PGCs，PGCs在这样的试验体系中是没有潜能的 [Donovan and de Miguel，2003]。存在这种差异的潜在原因有几方面，在本章的引言中已提及。例如，它可能与人睾丸组织对形成畸胎瘤有相当的耐受性（相对于其他生殖细胞肿瘤，如精原细胞瘤）有关，这个特性有别于几种品系的小鼠。

5.6 冻存

难以冻存与难以维持hEGC培养物处于不分化状态是一致的，我们的体会是：冻存伴随着细胞的多能标志物的进一步减少。我们所采用的试剂与操作方法类似于冻存hESC培养物所采用的试剂与方法。

5.7 材料来源

项目	供应商
抗体	见表5.1，一抗的列表*
Aquamount	BDH (Merck)
BCIP	Roche Molecular Biochemicals
带培养小室的玻片	Shandon，Life Sciences International (Europe) Ltd
胶原酶Ⅳ	Sigma
锥底离心管，15ml/50ml	Falcon
Cryo 1℃ 冻存罐	Nalge Nunc
冻存管	Corning International
DAPI	Vector
二甲基亚砜 (DMSO)	Sigma
DMEM	Invitrogen/PAA
DNA酶Ⅰ	Sigma
ESC-测试的胎牛血清	PAA Laboratories

续表

项目	供应商
FGF-2	Pepro Tech
纤连蛋白（牛；1mg/ml）	Sigma
Forskolin	Sigma
明胶，2%无菌溶液	Sigma
Hank's 平衡盐溶液（HBSS）	Sigma
热灭活的新生牛血清	Invitrogen
人重组成纤维细胞生长因子 2（FGF-2）	Cell Sciences
人重组白细胞抑制因子（LIF）	Chemico
KaroMAX 秋水仙胺	Invitrogen
Knockout DMEM（KO-DMEM）	Invitrogen
Knockout 血清替代物（KO-SR）	Invitrogen
L-谷氨酰胺	Sigma
LMP 琼脂糖	Sigma
Matrigel	BD Biosciences
2-巯基乙醇	Sigma
NBT	Roche Molecular Biochemicals
非必需氨基酸	Invitrogen
青霉素/链霉素	Invitrogen
RNA Later	Qiagen
STO 细胞（CRL-1503）	ATCC 或 ECACC
组织培养瓶/皿	Iwaki
TRI 试剂	Sigma

注：TRA 抗体原液。

（陈实平　译）

参考文献

Aflatoonian, B., and Moore, H. (2005). Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**:530–535.

Donovan, P.J., and de Miguel, M.P. (2003). Turning germ cells into stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**:463–471.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **22**:53–54.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**:154–156.

Hanley, N.A., Ball, S.G., Clement-Jones, M., Hagan, D.M., Strachan, T., Lindsay, S., Robson, S., Ostrer, H., Parker, K.L., and Wilson, D.I. (1999). Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech. Dev.* **87**:175–180.

Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortes, L.,

McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., and Wilson, D.I. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* **91**:403–407.

Liu, S., Liu, H., Pan, Y., Tang, S., Xiong, J., Hui, N., Wang, S., Qi, Z., and Li, L. (2004). Human embryonic germ cells isolation from early stages of post-implantation embryos. *Cell Tissue Res.* **318**:525–531.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7634–7638.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**:841–847.

McLaren, A., and Durcova-Hills, G. (2001). Germ cells and pluripotent stem cells in the mouse. *Reprod. Fertil. Dev.* **13**:661–664.

Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* **240**:488–498.

Onyango, P., Jiang, S., Uejima, H., Shamblott, M.J., Gearhart, J.D., Cui, H., and Feinberg, A.P. (2002). Monoallelic expression and methylation of imprinted genes in human and mouse embryonic germ cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:10599–10604.

Park, J.H., Kim, S.J., Lee, J.B., Song, J.M., Kim, C.G., Roh, S. 2nd, and Yoon, H.S. (2004). Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells. *Mol. Cells* **17**:309–315.

Polkinghorne, J. (1989). Review on the guidance on the research use of embryonic and fetal material. London: HMSO.

Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., and Donovan, P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359**:550–551.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Littlefield, J.W., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Cui, Y., Cheng, L., and Gearhart, J.D. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:113–118.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13726–13731.

Shamblott, M.J., Kerr, C.L., Axelman, J., Littlefield, J.W., Clark, G.O., Patterson, E.S., Addis, R.C., Kraszewski, J.N., Kent, K.C., and Gearhart, J.D. (2004). Derivation and differentiation of human embryonic germ cells. In Handbook of Stem Cells. R. Lanza, J. Gearhart, B.L. Hogan, D. Melton, R.A. Pedersen, J.A. Thomson, and M. West, editors: Elsevier Academic Press, pp. 459–470.

Stevens, L.C. (1981). Genetic influences on teratocarcinogenesis and parthenogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **45**:93–104.

Turnpenny, L., Brickwood, S., Spalluto, C.M., Piper, K., Cameron, I.T., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2003). Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. *Stem Cells* **21**:598–609.

Turnpenny, L., Cameron, I.T., Spalluto, C.M., Hanley, K.P., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2005). Human embryonic germ cells for future neuronal replacement therapy. *Brain Res. Bull.* **68**:76–82.

Turnpenny, L., Spalluto, C.M., Perrett, R.M., O'Shea, M., Hanley, K.P., Cameron, I.T., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2006). Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. *Stem Cells* **24**:212–220.

第6章 人胚胎癌（EC）干细胞系的来源和培养

STEFAN PRZYBORSKI
School of Biological and Biomedical Science，Durham University，South Road，Durham DH1 3LE，UKStefan. przyborski@durham. ac. uk

6.1 背景知识

6.1.1 引言

畸胎癌（teratocarcinomas）是一种结构多样性肿瘤，通常由形成畸胎瘤（teratoma）的一系列分化的细胞类型和一群称作胚胎癌细胞（EC）的干细胞构成。在肿瘤内胚胎癌细胞进行分化，这一过程漫画式地再现了胚胎发生过程。畸胎瘤最常发生在性腺，属于生殖细胞肿瘤（GCT）。卵细胞会活化并表现出孤雌生殖的特性，导致胚胎发

育紊乱，形成卵巢皮样囊肿，这是生殖细胞肿瘤最基本的特征，并且多数情况下，这种肿瘤是良性的。在睾丸中，GCT可由原始生殖细胞在减数分裂前发生转化而引起，这样的肿瘤通常是恶性的，可能由各种胚胎组织（畸胎瘤）和胚胎滋养层（绒毛膜癌）的胚外结构或卵黄囊（卵黄囊癌）组成。

多年来，畸胎癌的形成与胚胎发育过程密切相关这一观点得到广泛的认可，同时认为EC细胞在一些方面与来源于早期胚胎未分化的干细胞很相似［参见综述 Andrew et al.，2001］。Stevens 和 Little（1954）首先在实验室中对小鼠的畸胎癌进行了研究，他们最先报道了约1/100的雄性129小鼠自发产生睾丸畸胎瘤。这种肿瘤也会通过异位移植晶胚（embryos）的方法在其他品系的小鼠中发生［Damjanov and Solter，1974］。在利用小鼠进行的实验中，Kliensmith 和 Pierce［1964］证明单个EC细胞就能在移植后发生多向分化，表明了这种细胞具有多向分化的能力。往囊胚中注射EC细胞可参与随后正常的胚胎发生并在嵌合动物体内产生分化的组织，这个实验进一步证明了这种细胞的分化潜能［Illmensee and Mintz，1975；Papaioannon et al.，1975］。通过在实验室对小鼠的研究，人们发现EC细胞与胚胎发生早期阶段的原始内胚层非常相似，这一观点被广泛接受。最近的实验结果表明在人类也是如此，有很多例子显示了人的胚胎细胞与相对应的恶性细胞——人EC细胞的相似性［参见综述 Andrew et al.，2001］。相应的，对培养的人EC细胞分化的研究提供了探索人类早期胚胎中控制细胞分化的分子机制的可能性。

尽管和早期胚胎很相似，但必须始终明确EC细胞来源于肿瘤。EC细胞通常是异倍体，核型异常。而且，由于在肿瘤中EC细胞的生长受到很强的选择压力，从而减弱了细胞分化的潜力，因为细胞分化本身会导致细胞的增殖能力受到限制。结果，与正常的胚胎组织相比，EC细胞系的分化能力降低，但在某些情况下，根据实验模型的不同，分化能力低也许并不是一件坏事。例如，在很多实验中，培养的鼠和人EC细胞被用来研究神经分化的过程［Andrews，1984；Jones-Villeneuve et al.，1982；Macpherson et al.，1995；McBurney et al.，1988；Przyborski et al.，2000；Stewart et al.，2003；可见第3章］。相对于原代细胞和胚胎干细胞，发育潜能受到较多限制的某种EC细胞系又提供了一种选择，因为原代细胞的数量和一致性是多变的，而技术要求更高、更难生长的胚胎干细胞有自发分化的趋势，可形成典型的所有三胚层组织。用人EC细胞作为早期胚胎发生研究的模型仍然是一种可行的选择，而且这也是一种简单稳定的实验系统，例如，用于研究胚胎外胚层细胞的命运决定［参见综述 Przyborski et al.，2004］。

6.1.2 人胚胎癌细胞系的培养

一般来讲，可以从畸胎瘤分离并建立EC细胞系，不管它们来源于哪里，只要有一群驻留的保持增殖的干细胞就可以了。另外就是细胞形态，到目前为止所有得到的鼠和人EC细胞谱系都具有共同的结构特征：一个小的胞质环围绕着核，有1～2个核仁，而且这种形态与胚胎干细胞很相似。EC细胞通常呈集落生长，集落内细胞紧密聚集，细胞之间黏附力强，常常没有明显界限。

许多广泛应用的细胞系都已经适应了在没有饲养层细胞的条件下生长，所以常规培养EC细胞在技术上并不是很难，这也使得产生大量性质均一的细胞成为可能。总体来

讲，培养人 EC 干细胞的要求与培养人胚胎干细胞是相近的，不需要特殊的（通常较贵）培养基添加物和饲养层细胞。DMEM（高葡萄糖成分，添加 2mmol/L L-谷氨酰胺）是培养 EC 细胞最常用的基本培养基。也有一些研究者更喜欢 α-MEM。培养基中通常要添加 10%灭活的胎牛血清（FBS）。建议在选择批次之前，通过检测一些 EC 细胞生长和分化的指标，从不同的供应商提供的不同批次的 FBS 中筛选出对细胞生长和分化作用最好的批次。我们用流式细胞术（见方案 6.5）来检测细胞表面的干细胞标志（SSEA-3，TRA-1-60）和分化标志（VINIS，A2B5，加视黄酸培养 7 天之后）。从大的耗材供应商处购买的标准的组织培养塑料瓶和多孔板都可满足人 EC 细胞的培养要求。EC 细胞也可在玻璃表面生长（如盖玻片、玻璃片小室），这种玻璃器皿的表面在使用前经过包被，例如用多聚赖氨酸（参见 6.2.8 节）。生长培养基中可添加抗生素，建议在移植肿瘤组织进行培养的早期使用（参见 6.2.1 和 6.2.2 节）。维持已建系的 EC 细胞生长要避免使用抗生素，因为这是不需要的，而且还会掩盖较差的细胞培养无菌操作技术。人 EC 干细胞群体的扩增及分化诱导按标准的细胞培养程序进行，所有细胞都培养在 37℃、5% CO_2的环境中。

如果能保持最佳条件，胚胎癌细胞就可健康的生长。细胞密度似乎是影响 EC 干细胞表型的一个最重要的可变因素。未分化的人 EC 细胞系在一般生长及传代阶段应维持较高的细胞密度（$>5\times10^4/cm^2$）（见 6.3.2 节）。

以下方法是使人 EC 干细胞系生长和维持的一般方法，多数方法用在培养已成功建系的 EC 细胞系的 TERA2 亚系，最初由 Fogh 和 Trempe [1975] 创立。这些方案对于特殊细胞系的特别需求也适用并能够调整，或者可以调整至适合于各个实验室的操作习惯。已经证明 TERA2 的亚系 NTERA2. cl. D1 [Andrew et al., 1984] 和 TERA2. cl. SP12 [Przyborski，2001] 是研究外胚层中控制细胞命运的分子机制和终末分化神经元形成很好的模型 [见综述 Przyborski et al., 2004]。这些细胞分化方法的例子被广泛应用于不同的人 EC 细胞系，尽管它们的发育潜能可能不同。

6.2 试剂的准备

6.2.1 生长培养基

(i) DMEM [高糖（4500mg/L）；吡哆醇 HCl；$NaHCO_3$；不含 L-谷氨酰胺] ………… 90%

(ii) 胎牛血清（FBS），经过检测的批次，在摇床水浴中 56℃灭活 30min … 10%

(iii) L-谷氨酰胺 ………… 2mmol/L

(iv) 抗生素（选用）：

青霉素 ………… 2.5U/ml

链霉素 ………… 2.5U/ml

6.2.2 收集培养基

添加抗生素（青霉素 250 U/ml；链霉素 250μg/ml；卡那霉素 10μg/ml；两性霉素

B 2.5μg/ml）的培养基，4℃可保存2周。

6.2.3 冻存培养基

(i) 生长培养基 …………………………………………………… 50%
(ii) FBS …………………………………………………………… 40%
(iii) DMSO ………………………………………………………… 10%

6.2.4 玻璃珠

直径3mm的玻璃珠，使用前需要酸洗：

(i) 将玻璃珠泡在浓盐酸中，置于通风橱过夜。

(ii) 倒掉盐酸，用自来水冲洗玻璃珠。

(iii) 用超纯水（UPW）冲洗玻璃珠三次，然后高压灭菌。

(iv) 烘箱中（约150℃）烤1～2天。

(v) 将珠子分装于带盖的玻璃试管中，每管约15个，然后高压灭菌。这样玻璃珠就可以在细胞培养中使用了。

6.2.5 视黄酸

全反式-视黄酸（购买一次使用的无菌包装），溶于DMSO的10mmol/L的贮存液，不要过滤。每小瓶分装500μl，贮存于－70℃避光处（光敏感）。

6.2.6 环己二乙酰胺

取0.6g环己二乙酰胺溶于10ml超纯水，配成0.3mol/L的贮存液。

6.2.7 有丝分裂抑制剂

(i) 胞嘧啶腺苷，1mmol/L贮存液，溶于UPW中。过滤除菌，在4℃条件下可保存2周。1∶1000稀释使用（终浓度1μmol/L）。

(ii) 氟脱氧尿苷，1mmol/L贮存液，溶于UPW中。过滤除菌，在－70℃条件下可保存2周。1∶100稀释使用（终浓度10μmol/L）。

(iii) 尿嘧啶核苷，1mmol/L贮存液，溶于UPW中。过滤除菌，在－70℃条件下可保存2周。1∶100稀释使用（终浓度10μmol/L）。

6.2.8 包被物质

下列物质可用于包被塑料或玻璃表面，以增强分化细胞的黏附或生长。每种基质的贮存液（100×浓缩）经过滤除菌后分装，贮存于－20℃。使用时用水溶液浸没塑料或玻璃表面12～24h，冲洗，存于4℃或立即使用。

(i) 多聚-D-赖氨酸，终浓度10μg/ml，溶于UPW中。

(ii) 多聚-L-鸟氨酸，终浓度10μg/ml，溶于UPW中。

(iii) 人胎盘层粘连蛋白，终浓度10μg/ml，溶于不含Ca^{2+}、Mg^{2+}的磷酸缓冲盐溶液中（PBSA）。

6.2.9　胰蛋白酶/EDTA

胰蛋白酶，0.25%（*W/V*），EDTA，1mmol/L，溶于 PBSA。

6.2.10　冲洗缓冲液（WB）

含有 5%FBS 和 15mmol/L 叠氮钠（0.1% *W/V*）的 PBSA。

6.2.11　固定剂

(i) Bouin 液：饱和苦味酸，70%（*V/V*），甲醛（37%～40%），25%（*V/V*），冰醋酸，5%（*V/V*）。

(ii) 多聚甲醛，4%（*W/V*），溶于 PBSA。

6.3　方案

6.3.1　克隆化 EC 细胞系的来源

来源于人畸胎瘤的细胞系最初是以异种移植被建立和保持的（Pierce et al.，1957）。直到 1970 年，包括 TERA2 在内的几种人 EC 干细胞系才被建立（Fogh and Trempe，1975）。早期的报道描述了从原始移植培养物分离及克隆人 EC 细胞，并认识到亲代培养物包含多种细胞类型，表明多能 EC 干细胞只代表了亲代细胞群体的一小部分（Andrew et al.，1984，1985；Thompson et al.，1984；Przyborski，2001）。例如，直接由肿瘤组织的亲代移植培养物建立的克隆化细胞系表现出易变性，而且几乎不表达多能干细胞的标志分子，通常只具有有限的细胞分化能力［Andrew et al.，1984，1985］。EC 成分的分离及纯化的人 EC 干细胞群体的获得最初是通过把肿瘤细胞系 TERA2 作为异种移植物移植给免疫缺陷的宿主而完成的。随后对从 TERA2 异种移植物得到的单个细胞的稀释，克隆化产生了广为人知的 NTERA2. cl. D1［Andrew et al.，1984］。人的 NTERA2. cl. D1 EC 干细胞表达高水平的细胞表面抗原 SSEA-3 和 SSEA-4，移植到合适的宿主时形成复杂的畸胎瘤，并在体外保持分化能力［Andrew et al，1984］。随后又建立了一种更直接的分离及得到人 EC 干细胞系的方法，该方法不需要通过动物来进行移植肿瘤系的传代［Przyborski，2001］。这种方法可应用于已建立的移植培养物或新鲜解剖分离的肿瘤组织。最初的移植技术被用来建立代表原始畸胎瘤的细胞系。但存在关于收集人活检组织的伦理及安全性的争议（见第 2 章）。

方案 6.1　人 EC 细胞的外植培养

试剂和材料

无菌

☐ 收集培养基（见 6.2.2 节）

☐ 生长培养基（见 6.2.1 节）

☐ PBSA
☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）
☐ $25cm^2$的塑料培养瓶
☐ 9cm 的培养皿
☐ 30ml 或 50ml 离心管
☐ 剃须刀片

步骤

(a) 与外科团队合作（见第 2 章），准备装有收集培养基的无菌容器，以便立即贮存及转移切下的组织。确保样品管上清楚地记录了描述的信息，内容包括名称、手术日期时间及必需的相关细节。

(b) 立即将样本转移到组织培养室。如果保存在收集培养基并置于 4℃环境中，组织可存活 1～2 天，但要避免长时间的保存。

(c) 用 PBSA 清洗组织两次，然后将样本转移到 9cm 的培养皿中。

(d) 去除非肿瘤的组织（如脂肪）及明显的坏死部分，加入少量的 PBSA，确保样本湿润。

(e) 用无菌剃须刀片将样本细切成 1mm 的小块。

(f) 加入 10ml PBSA，用移液管将切碎的组织转移到离心管中。

(g) 用 PBSA 将组织洗 2～3 次，每次清洗时让样品自然沉降，不需离心。

(h) 将组织块转移到 $25cm^2$的培养瓶（每瓶大约 25 块）。

(i) 倾斜培养瓶，用移液管从瓶子的角落吸去 PBSA，加入 1ml 含有抗生素的生长培养基。

(j) 倾斜培养瓶，使组织块均匀分布于生长表面。

(k) 将培养瓶于 37℃中培养 24h，在此过程中不要移动培养瓶。待组织块已经贴附到培养瓶上，在随后的几天小心地添加生长培养基至 10ml。

(l) 每周换一到两次培养基以促进细胞从组织块向外生长。在这段时间里可明显的看到细胞从组织块向外迁移并增殖。

(m) 继续培养，经常更换培养基，直到组织块周围铺满单层细胞。

(n) 用 1ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液分离培养物，37℃，5min。

(o) 用手掌轻拍培养瓶的侧面，通过快速的侧向运动使细胞离开培养瓶。

(p) 加入 9ml 生长培养基冲洗整个培养瓶。用移液管收集细胞并轻轻地上下吹打几次，使所有的细胞团散开。

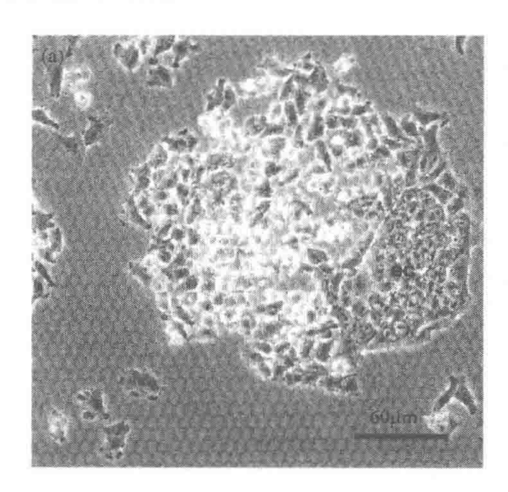
(q) 450g 离心细胞，用 10ml 生长培养基清洗。

(r) 用 10ml 生长培养基重悬最后得到的细胞团，并将其平分到两个 $25cm^2$的培养瓶中。

(s) 37℃继续培养，每 2～3 天换一次培养基。

(t) 重复上述酶消化传代步骤以获得足够数量的细胞用于低温贮存移植系和细胞样品（见 6.5 节）。

注意： 至关重要的是，使用、收集和处理人体组织要遵循一定的规定和批准（见第 2 章）。保证生长培养基中一直含有抗生素直到外植培养物被很好的建立，低温贮存的样本取回时不被污染。最初外植培养物包含多种细胞类型，表现出异质性。随着时间的推移，肿瘤细胞会成为主要的细胞类型。但这时这些培养物仍然是异质的，仅含有 1%～2%的 EC 干细胞（图 6.1）。尽早低温保存细胞、减少传代次数可以获得更接近原肿瘤性质的细胞。



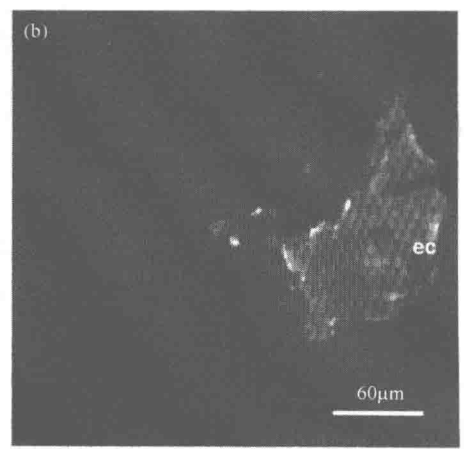


图 6.1　来源于人生殖细胞肿瘤的外植培养物的相差图（a）和相关的 SSEA-3 免疫荧光定位（b）注意只有少部分细胞呈现 SSEA 阳性染色，表明培养物中有 EC 干细胞。比例尺：60μm

方案 6.2　克隆化的 EC 细胞系的建立

无菌或无菌准备

- ☐ 照射的 STO 小鼠饲养细胞 [Martin and Evans，1975]，照射时约 70%细胞汇合（又见方案 11.2）
- ☐ PBSA
- ☐ PBSA/5FB：含有 5%胎牛血清的 PBSA
- ☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）
- ☐ 阶段特异性胚胎抗原-3（SSEA-3），多能干细胞表面的一种抗原标志分子（见图 6.1）。
- ☐ Polyscience BioMag 微粒，抗小鼠 IgM（用于识别 SSEA-3 的 IgM 独特型）
- ☐ 15ml 的聚丙烯离心管
- ☐ 多孔板，6 孔和 12 孔
- ☐ 培养皿，3.5cm 和 9cm
- ☐ 玻璃巴斯德移液管，在火焰上拉成细小的尖头

非无菌

- ☐ 血细胞计数板

□ 0.4%W/V 的台盼蓝或 0.15%W/V 的赤藓红 B（又名地衣红 B）

□ 倒置显微镜，用 70%的酒精擦净，置于方便使用显微镜的垂直层流罩内。要注意由于使用了显微镜，II 级生物安全橱的安全状况可能会打折扣，在使用前应该检查一下。

步骤

(a) 使用移植细胞中最早可传代的生长汇合的细胞（见上）。

(b) 吸出生长培养基，用 5ml PBSA 清洗。

(c) 加入 1ml 胰蛋白酶/EDTA 并倾斜培养瓶，保证单层细胞被覆盖。

(d) 37℃孵育细胞，直到细胞变圆并开始脱落（5min）。用手掌轻拍培养瓶的侧面，通过快速的侧向运动使逗留的细胞离开培养瓶。

(e) 加入 9ml 生长培养基冲洗整个培养瓶以获得尽可能多的细胞。用移液管轻轻上下吹打几次使所有细胞团散开，得到单细胞悬液。

(f) 用血细胞计数板计数细胞。一般来讲，细胞存活率要大于 95%，这可以通过一些简单的染料排斥分析法来检测（例如，用 0.4%W/V 的台盼蓝或 0.15%W/V 的赤藓红 B 染色 [Freshney，2005]）。

(g) 用 5ml PBSA/5FB 将细胞稀释到 1×10^7/ml。

(h) 将细胞悬液与 1∶5 稀释的 SSEA-3 在 15ml 的聚丙烯离心管中，4℃条件下共孵育 45min。

(i) 离心细胞（450g，3min），在 4℃条件下，用 PBSA/5FB 洗 3 次。

(j) 通过直接的阳性磁粒分选分离与 SSEA-3 发生免疫反应的细胞，磁粒上带有 BioMag 的抗小鼠 IgM 抗体。按照制造商提供的操作步骤进行，简述如下：

i) 将磁粒与细胞在 4℃条件下孵育 30min。

ii) 轻轻混合离心管中的物质，靠管壁放一块磁铁停留 30s 使细胞与磁粒结合而聚集。

iii) 磁铁仍在原位，小心倾去上清，使细胞留在管壁上。

iv) 拿开磁铁，将细胞重悬于 PBSA/5FB 中。

v) 重复分离过程，增加 SSEA-3 阳性的细胞的纯度。

(k) 用 5ml PBSA/5FB 将分离的细胞重悬，血细胞计数板计数。大约 1000 个细胞接种到 9cm 的培养皿中，加 10ml PBSA/5FB。

(l) 将带有相差镜头的倒置显微镜放到无菌的环境中（例如用合适的层流罩；用乙醇擦净显微镜的载物台以保证无菌）。用火焰拉制的细小玻璃吸管挑出单个细胞放入滴在 3.5cm 培养皿中的 100μl 月牙形 PBSA/5FB 中。用显微镜的 40 倍物镜检查挑出的是否是单个细胞。

(m) 把每一个细胞转移到 12 孔板的不同孔中，孔中有经照射的 STO 饲养细胞及生长培养基。

(n) 维持共培养 10 天，每 2～3 天换一次培养基。

(o) 每孔加 0.3ml 胰蛋白酶/EDTA 以移动共培养的细胞。将全部细胞悬液接种到有新鲜饲养细胞的 6 孔板中，加 3ml 培养基。按步骤（n）的方法共培养。随着干细胞

群体的增加可在饲养层细胞中明显地看到 EC 细胞（图 6.2）。

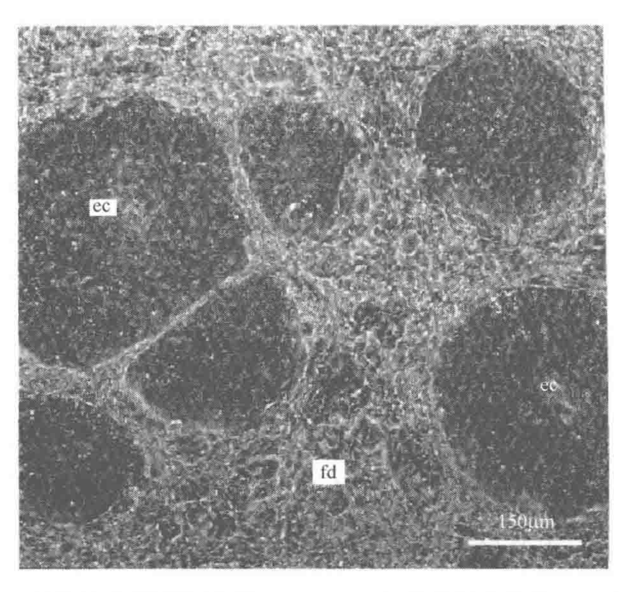


图 6.2　最初在 STO 饲养细胞（fd）上生长的克隆化的人 EC 干细胞系的集落（ec）。这张相差图是在第三次传代后拍摄的，此时同一克隆系的许多集落开始扩张与合并。这个特殊的例子不是在新鲜的饲养细胞上传代，而是经过随后的处理变成饲养细胞非依赖型。比例尺：150μm

（p）当 EC 细胞的大集落很明显时，按（b）～（e）步骤中描述的方法消化培养物，接种到新的不含饲养细胞的 6 孔板中，加入培养基。留存的 STO 饲养细胞会逐渐死亡，留下的是不需饲养细胞即可存活的人 EC 干细胞克隆化群体（图 6.3）。

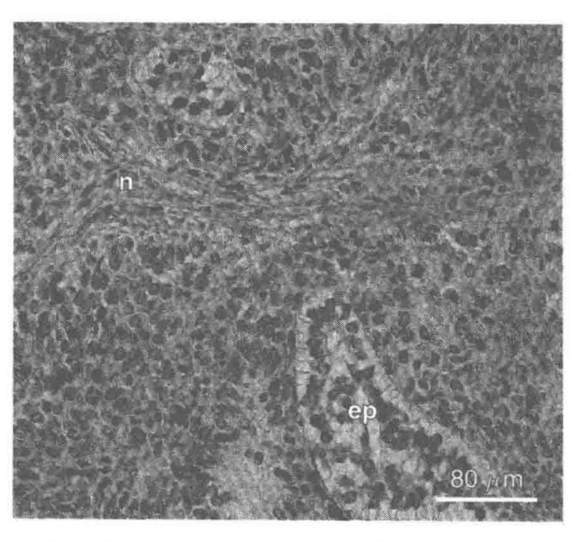


图 6.3　克隆化的人 EC 干细胞谱系。该例显示的是 TERA2. cl. SP12［Pzyborski，2001］。细胞必须保持高度汇合，在最佳生长条件下会长成均匀的单层细胞。比例尺：30μm

注意： BioMag 的磁粒直径约 1μm，由于形状不规则，使得表面积增大（>100m^2/g），比规则的球状微粒大 20～30 倍，在使用较低量磁粒时增强了其结合能力。当培养到 48h 以上时，随着细胞表面的翻转，磁粒会自动的从细胞膜上解离下来。至少在前2～3 次传代要维持与饲养细胞共培养，使新分离的克隆谱系生长达到能独立生长的数量。饲养细胞帮助维持 EC 干细胞的表型，如果没有这些饲养细胞，EC 细胞很可能自动分化。一旦不依赖于饲养细胞，克隆化的 EC 干细胞系会疯长并具有均质的表型。它们必须维持最佳生长状态并在细胞高度汇合时传代；否则，它们就会有自动分化的倾向。

6.3.2 EC 细胞的常规传代及收获

有两种方法。第一种（见方案 6.3）是机械法，这种方法简单快捷，可以避免整个细胞培养物的分离。这是很重要的，因为细胞接触和高度汇合的保持可以防止其在培养过程中自发分化。第二种是用酶处理将培养的细胞消化成单细胞悬液。这在用细胞计数板计数细胞或为流式实验准备细胞时是必需的。第二种方法（方案 6.4）有时可用于细胞传代，但不是常规传代推荐使用的方法，因为它可能随时间推移改变细胞的性质。两种方案所用的来自 75cm^2的组织培养瓶中生长汇合的细胞都是已经处理过的。

方案 6.3　机械分离法继代培养 EC 细胞

试剂和材料

无菌

☐ 生长培养基（见 6.2.1 节）
☐ PBSA
☐ 酸洗的玻璃珠（见 6.2.4 节）
☐ 75cm^2的塑料培养瓶

步骤

(a) 从培养的细胞中吸出培养基，用 5ml PBSA 清洗。

(b) 加入约 15 个酸洗的 3mm 的玻璃珠和 5ml 生长培养基。

(c) 小心地前后、左右摇动培养瓶，使玻璃珠滚过细胞使其离开培养瓶表面，注意不要晃到瓶颈处。

(d) 用 10ml 的移液管收集悬起的细胞，将移液管的尖端靠在瓶子的底部角落，上下轻轻吹打几次，吹散较大的细胞团。

(e) 用同一个吸管收集细胞悬液并转移到一个新的 75cm^2的培养瓶中，加 50ml 生长培养基。

(f) 确保细胞悬液充分混匀后等分到三个新的 75cm^2的培养瓶中（每瓶 20ml），1∶3分离。

方案 6.4 酶解法取样及继代培养 EC 细胞

试剂和材料

无菌

☐ 生长培养基（见 6.2.1 节）

☐ PBSA

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）

☐ 75cm^{2}的塑料培养瓶

非无菌

☐ 血细胞计数板

☐ 0.4%*W/V* 的台盼蓝或 0.15%*W/V* 的赤藓红 B

步骤

(a) 从培养的细胞中吸出培养基，用 5ml PBSA 清洗。

(b) 加入 1ml 胰蛋白酶/EDTA 并倾斜培养瓶，保证单层细胞被覆盖。

(c) 37℃孵育细胞直到细胞变圆并开始脱落（3～5min）。用手掌轻拍培养瓶的侧面，通过快速的侧向运动使逗留的细胞离开培养瓶。

(d) 加入 9ml 生长培养基冲洗整个培养瓶以获得尽可能多的细胞。用移液管轻轻上下吹打几次使所有的细胞团散开。

(e) 用血细胞计数板计数细胞。一般来讲，细胞存活率要大于 95%，这可以通过一些简单的染料排斥法来检测（例如，用 0.4%*W/V* 的台盼蓝或 0.15%*W/V* 的赤藓红 B 染色）。

(f) 将细胞重新接种到新的塑料组织培养器皿中，5×10^4个细胞/cm^2（相当于每个 75cm^{2}的培养瓶中接种 3.75×10^6个细胞），加入适量的生长培养基（每个 75cm^{2}的培养瓶中 20ml）。

注意： EC 细胞可以很快地贴壁并恢复，保持在 37℃、5%CO_2及一定湿度条件下，可在 3～4 天就形成汇合生长的单细胞层（见图 6.3）。在这段时间细胞不需要饲养细胞的帮助。可根据细胞的汇合程度来决定传代时分离的比例，从 1∶2 到 1∶4。加过胰蛋白酶后可不必洗细胞，加入足够的含 FBS 的生长培养基即可使胰蛋白酶失活。

6.4 特征

6.4.1 EC 表型的确定

确定培养的人 EC 干细胞表型的一种最直接的方法就是用流式细胞术检测细胞表面抗原。这种方法相对简单，可提供有关培养物的状况、干细胞所占比例及分化细胞表型等精确、定量的数据。通过比较来源于生殖细胞肿瘤的人细胞系表面的一系列抗原证

实，细胞表面抗原阶段特异性胚胎抗原-3（SSEA-3）和-4（SSEA-4）及 TRA-1-60 是人 EC 干细胞的特征性标志［Andrews et al.，1996］。通常，汇合后高密度的人 EC 干细胞在最佳生长条件下高水平表达这些分子标志。但是，非最佳培养条件及细胞分化会导致 SSEA-3 的表达量减少，而细胞分化特定通路的相关蛋白表达上调［Andrew，1982；Przyborski et al.，2000］。方案 6.5 提供了一种常用的流式细胞术分析人 EC 干细胞的方法。

方案 6.5　流式细胞术检测 EC 细胞表面标志

试剂和材料

无菌或无菌准备

☐ 汇合生长的 EC 细胞

☐ PBSA

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）

☐ 冲洗缓冲液（WB；见 6.2.10 节）

☐ 一抗：例如，SSEA-3 上清（Developmental Studies Hybridoma Bank），WB 1∶5稀释

☐ 二抗，荧光标记，WB 稀释：例如，大鼠抗小鼠 IgM 用 WB 1∶20 稀释，用于检测小鼠单克隆抗体 SSEA-3

☐ 96 孔微量滴定板，圆底，带盖

非无菌

☐ 活细胞染料：0.4%*W/V* 的台盼蓝或 0.15%*W/V* 的赤藓红 B

☐ 血细胞计数板

☐ 微量滴定板离心机或用于正规离心机的微量滴定板支架

☐ 流式细胞仪

步骤

(a) 选用一瓶生长汇合的人 EC 干细胞（见图 6.3），从培养的细胞中吸出培养基，用 5ml PBSA 清洗。

(b) 加入 1ml 胰蛋白酶/EDTA 并倾斜培养瓶，保证单层细胞被覆盖。

(c) 37℃孵育细胞直到细胞变圆并开始脱落（3～5min）。用手掌轻拍培养瓶的侧面，通过快速的侧向运动使逗留的细胞离开培养瓶。

(d) 加入 9ml 生长培养基冲洗整个培养瓶以获得尽可能多的细胞。用移液管轻轻上下吹打几次使所有细胞团散开，得到单细胞悬液。

(e) 用血细胞计数板计数活细胞。一般来讲，细胞存活率要大于 95%，这可以通过一些简单的染料排斥法来检测（例如，用 0.4%*W/V* 的台盼蓝或 0.15%*W/V* 的赤藓红 B 染色）。

(f) 离心细胞（450g，3min），用 WB 重悬细胞，调整其浓度为 1×10^7/ml。

(g) 将适量的抗体溶液（每孔 50μl）加入圆底的 96 孔板中（避免使用相邻的孔以防止液体溢出后互相污染），例如，SSEA-3 上清用 WB 1∶5 稀释。纯化的单克隆抗体通常稀释倍数较高，如用 WB 1∶100 稀释。（NB：可以通过预先滴定来选择合适的稀释比例，以获得较高的结合率）。

(h) 在含有抗体的孔中加入细胞悬液，每孔 50μl（约 5×10^5/孔）。

(i) 盖上盖子，4℃条件下置于定轨摇床中轻摇 30min。

(j) 将细胞在 460g 的转速下离心 3min。在移去上清之前反转细胞板检查细胞团。

(k) 加入 100μl WB，离心细胞，弃上清，重复两次。最后一次不加 WB。

(l) 加入 50μl 荧光标记的二抗，例如 1∶20 稀释的大鼠抗小鼠 IgM，用于检测 SSEA-3。

(m) 盖上盖子，置于轨道摇床中于 4℃、避光条件下轻摇 30min。

(n) 按照上述方法用 WB 清洗以除去二抗。

(o) 将细胞转移到标记好的、含 0.2ml WB、用于做流式的管中。在过流式细胞仪之前将细胞置于冰上。

(p) 用流式细胞仪检测荧光强度，根据制造商提供的说明书设定适当的滤光器。

注意： 必须保证单细胞悬液中没有细胞聚集，以使得通过流式细胞仪的是单个细胞，所以实验前要在显微镜下检查细胞悬液。同时要做阴性对照来设置背景阈值。如果不能立即过流式仪，也可以用多聚甲醛的温和溶液（0.2%W/V 溶于 PBSA）固定细胞，4℃过夜暂时保存样本。

6.4.2 发育潜能的评价

6.4.2.1 体内畸胎瘤的生长

众所周知，将人的胚胎干细胞和恶性的 EC 干细胞植入免疫缺陷的宿主时会形成由多种分化细胞类型组成的复杂的畸胎瘤［Andrew et al.，2001；Przyborski 2005；Cooke et al.，2006］。这一点首先被 Kleinsmith 和 Pierce［1964］证明，他们指出将小鼠肿瘤的单个 EC 细胞移植到新的宿主会导致新的畸胎瘤形成，并且与原来的肿瘤结构相似。事实上，这是在建立 EC 干细胞系之前保存 EC 干细胞的一种方法。现在，很多科学家使用细胞移植和畸胎瘤的生长作为评价新产生的胚胎干细胞和 EC 干细胞系的常规方法［见 Przyborski 的综述，2005］。体外实验可以更多地控制细胞分化的特征，但这种方法是有局限性的。细胞培养目前还不能为三维细胞生长提供适当环境，无法促进相邻细胞和组织间的相互作用，以及接触不到生长因子及组合的信号分子等，这可能就是为什么植入的干细胞能够极度分化的原因。方案 6.6 描述了在免疫缺陷小鼠中由人的 EC 干细胞产生皮下异种移植肿瘤的简单方法。

方案 6.6　作为皮下异种移植物的 EC 细胞的生长

试剂和材料

无菌或无菌准备

- □ 人 EC 细胞
- □ 收集培养基（如果发生的肿瘤需要培养）
- □ 生长培养基（如果发生的肿瘤需要培养）
- □ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）
- □ PBSA
- □ Hamilton 注射器及 21 号针头

非无菌

- □ 裸鼠（*nu/nu*）
- □ 血细胞计数板
- □ 活性染料：0.4%*W/V* 的台酚蓝或 0.15%*W/V* 的赤藓红 B

步骤

（a）用 1ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液收获人 EC 干细胞（见图 6.3），使之形成单细胞悬液，按照方案 6.5（e）步骤所描述的用细胞计数板计数活细胞。

（b）洗细胞，重悬于 PBSA 中，调整细胞浓度为 1×10^7/ml。

（c）用 21 号针吸含有 5×10^5 细胞的 50μl PBSA（可使用 Hamilton 注射器），皮下注射到成年雄裸鼠的腹侧。

（d）遵照善待动物相关条例将裸鼠养 12 周，通常在畸胎瘤还是一个小团块、在皮下靠近移植部位可以触摸到时就要进行首次鉴定，鉴定时要记录肿瘤的位置和用测径钳测量肿瘤的大小，并称量动物体重。

（e）在合适的时候（比如肿瘤直径达到 1cm）时，处死动物（用批准的、规范的操作）并立即取下肿瘤组织，当心不要连带任何宿主组织。

（f）采用什么方法分析组织将决定接下来的处理方法。例如，要做冰冻切片就要将组织冻起来，而石蜡包埋和组化分析要先固定组织。有很多固定组织的方法，包括 Bouin's 溶液（见 6.2.11 节），该溶液可以很好的保存组织形态，常用于一般的组化（图 6.4；彩版 6）。或者用 4%的多聚甲醛，也可以保持组织结构，石蜡包埋及切片后更适合做免疫组化。

（g）另外，肿瘤组织可外植培养。为保持细胞活性，在将组织运输到培养地点时应将其放在 37℃的收集培养基中。在进行组织培养时，按照前面描述的步骤（见方案 6.1）进行。

注意：这些步骤必须遵守研究用动物的相关规定，只能由经过专门训练的经批准的人员来操作，必须始终善待动物。这些异种移植实验需要以免疫缺陷动物作为宿主，如裸鼠，皮下移植时尤其要用到裸鼠。动物的体重是肿瘤发生的重要监测指标，尤其是在

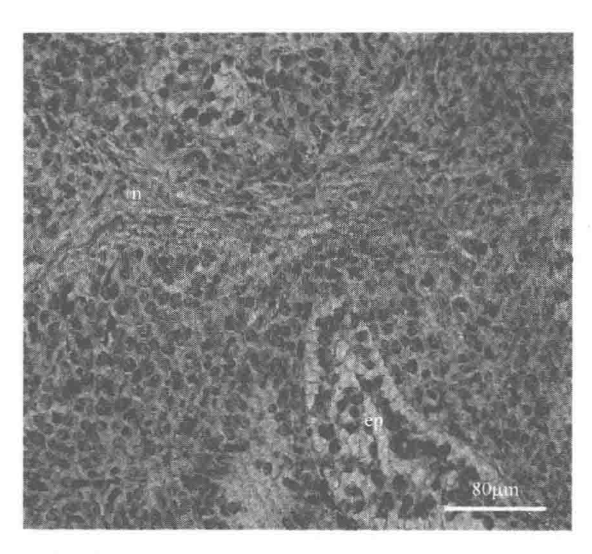


图 6.4　人 EC 干细胞形成畸胎瘤，可用来证明这种细胞的发育潜能。将 TERA2. cl. SP12 干细胞移植到免疫缺陷的宿主的皮下时，会形成异种移植的肿瘤。普通的苏木素-伊红（HE）染色显示了肿瘤中的多种结构，包括神经组织（n）和原始上皮（ep）。比例尺：80μm（见彩图 6）

生长中的异体移植物不是很明显的情况下。

6.4.2.2　外源性刺激引起的体外分化

培养的哺乳动物 EC 干细胞被认为是研究体外胚胎发生早期阶段的有用模型。Jones-Villeneuve 等［1982］和 McBurney 等［1988］的工作首先证明了视黄酸可引起培养的小鼠 EC 干细胞分化，形成神经元和胶质细胞群体。随后，Macpherson 和 McBurney［1995］报道了在研究神经发育过程中小鼠 P19 EC 干细胞生长和分化的具体方法。后来这些方法被其他的研究者采用，用于研究人 EC 干细胞的分化［Andrews et al.，1984；Pera et al.，1989；Stewart et al.，2003；Thompson et al.，1984］。TERA2 的亚系在该项研究中尤其有用［Andrews et al.，1984；Horrocks et al.，2003；Przyborski 2001；Przyborski et al.，2000；Stewart et al.，2003］。下面是诱导培养的人 EC 干细胞形成神经衍生物的经典方法，这里介绍了两种方法：方案 6.7 描述了细胞以单层贴壁的方式生长；而方案 6.8 中，细胞在接种到包被表面之前是悬浮生长的。

方案 6.7　呈黏附单层的 EC 干细胞的分化

试剂和材料

无菌

□ 培养的 EC 干细胞（见方案 6.2）
□ 生长培养基（见 6.2.1 节）
□ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）

☐ 视黄酸（见 6.2.5 节）
☐ 阿糖胞苷（见 6.2.7 节）
☐ 氟脱氧尿苷（见 6.2.7 节）
☐ 尿嘧啶（见 6.2.7 节）
☐ 75cm^{2}的培养瓶

步骤

(a) 用 1ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液收获 EC 干细胞（见图 6.3），使之形成单细胞悬液，按前述方法计数细胞（见方案 6.4）。

(b) 要诱导细胞分化，按照 2×10^4/cm^{2}的密度接种细胞（相当于每个 75cm^{2}的培养瓶中接种 1.5×10^6个细胞，加入含有 10μmol/L 视黄酸的生长培养基（每瓶 20ml）（阶段 1）。细胞会在 24h 内贴壁，在 3～4 天后形成松散汇合的单层细胞。细胞密度会继续增加，但一般来讲不会生长过度，因为大部分细胞开始分化，并最终到达有丝分裂期后阶段。神经元群体位于其中，非神经细胞将在 2～3 周内可以区分（图 6.5）。

(c) 在分化的开始阶段（A1 阶段），每 3～4 天更换一次含有视黄酸的培养基。

(d) 21 天后，按前述方法用胰蛋白酶/EDTA 溶液消化培养的细胞，此时 37℃条件下的孵育时间要延长到 7～10min。

(e) 加入 10ml 生长培养基，轻轻上下吹打细胞悬液，打散所有残留的细胞团，形成单细胞悬液。

(f) 将细胞平均分种到 4 个新的培养瓶中［大小与（b）步骤中使用的相同］，在不含视黄酸的培养基中继续培养 4～6 天（A2 阶段）。在此过程中，可以辨认出在平铺的非神经细胞背景上生长的神经元（图 6.6）。

(g) 从培养的 A2 阶段的细胞中吸去培养基，加入 1ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液，室温下放置 2min。

(h) 用手掌轻拍水平放置的培养瓶的侧面，短暂急速地拍打 5 次，产生侧向运动使贴附不紧的细胞脱落下来。

(i) 加入 10ml 生长培养基，收集酶法/机械法分离下来的细胞。

(j) 将两瓶以上细胞混合，计数细胞，清洗，然后用生长培养基重悬细胞。

(k) 将细胞按 2×10^5/ cm^{2}的密度接种（A3 阶段），加入含有下列物质的培养基（两种任选）：

(i) 1μmol/L 阿糖胞苷（只在开始 10 天添加），10μmol/L 氟脱氧尿苷，10μmol/L 尿嘧啶，增加神经细胞的纯度并减少非神经细胞的增殖（图 6.7）。

或 (ii) 0.1μmol/L 阿糖胞苷（只在开始 10 天添加），3μmol/L 氟脱氧尿苷，5μmol/L 尿嘧啶，限制星形胶质细胞的增殖。

注意：*这些方法中使用的是前面描述的* TERA2 *的谱系*［Andrews et al.，1984；Pleasure et al.，1992；Przyborski et al.，2000］，*尤其是克隆化的* TERA2. c1. SP12 *细胞系*［Przyborski，2001；Stewart et al.，2003］，*也可以用其他的* EC *干细胞系来研究*。

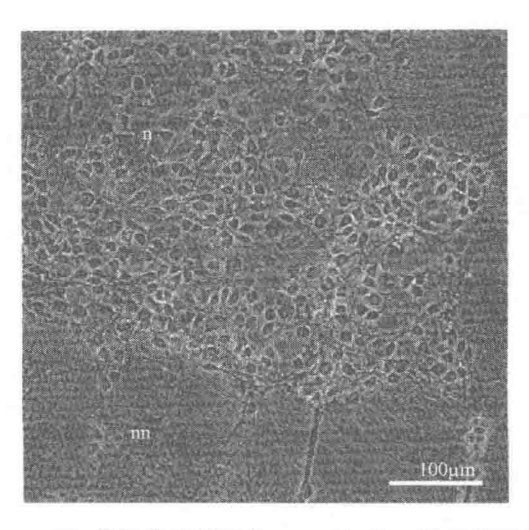


图 6.5　10μmol/L 的视黄酸诱导人 EC 干细胞 3 周后神经元的产生。该相差图显示了分化细胞的异质培养物，包括从形态上可以区分的神经元（n）和非神经细胞（nn）。比例尺：100μm

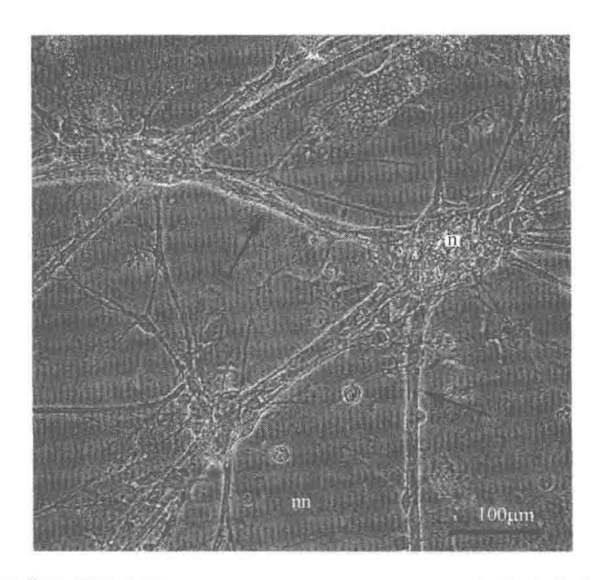


图 6.6　视黄酸诱导分化 21 天后将神经元从单层细胞上分离出来，当这些培养物传代后重新生长时，神经元（n）会在非神经细胞（nn）上生长，神经核周体通过成束的神经突（箭头所指）彼此连接形成聚集。比例尺：100μm

生长 2～3 周后（A3 阶段），通过细胞黏附的不同，可得到高纯度（>95%）的 EC 干细胞来源的神经元群体。星形胶质细胞可以很好地贴壁，而神经元的贴附要松散得多。A3 阶段后，可重复（g）～（k）步骤使神经细胞的纯度从>95%提高到>99%。星形胶质细胞可直接在塑料的组织培养器皿或包被了多聚-D-赖氨酸（10μg/ml）的表面培养。为了促进神经元的发育，尤其是神经突起的伸出，要将神经元接种在包被了多聚-

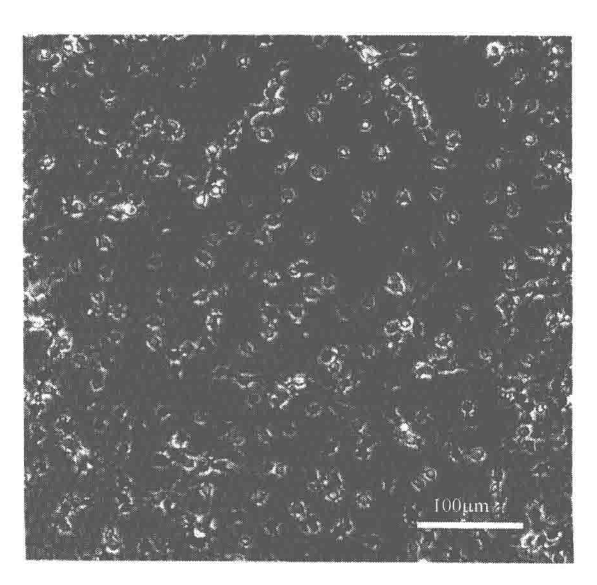


图 6.7　纯化的来源于人 EC 干细胞的神经元群体。在培养基中添加了有丝分裂抑制剂来控制非神经细胞的增殖。比例尺：100μm

L-鸟氨酸和层粘连蛋白的培养器皿中。也有报道其他类型的外源性化学试剂能诱导 EC 干细胞以其他方式分化。例如，TERA2. c1. SP12 EC 细胞与 3μmol/L HMBA 共培养 3～4 周会形成相对同质的、由扁平上皮样细胞而不是神经元构成的细胞群体（[Przyborski et al.,2004]；图 6.8）。

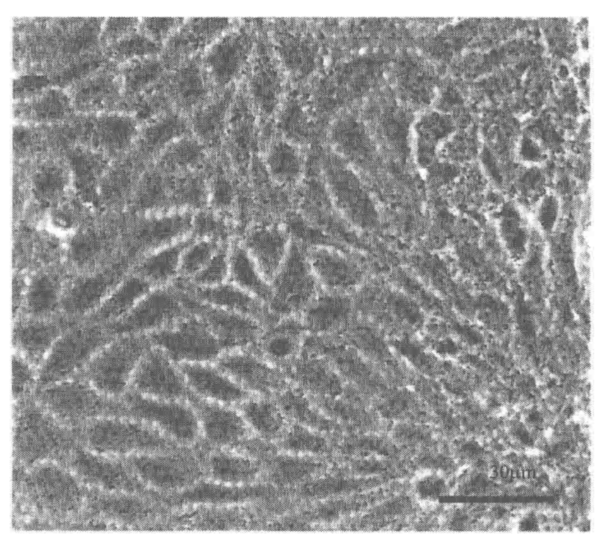


图 6.8　人 EC 干细胞与 3μmol/L HMBA 共培养 21 天形成由扁平上皮样分化细胞构成的相对同质的培养物，几乎没有神经方向的分化。比例尺：30μm

方案 6.8　呈悬浮细胞团的 EC 干细胞的分化

试剂和材料

无菌或无菌准备

- ☐ 培养的 EC 干细胞（见方案 6.2）
- ☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 6.2.9 节）
- ☐ 视黄酸（见 6.2.5 节）
- ☐ 阿糖胞苷（见 6.2.7 节）
- ☐ 氟脱氧尿苷（见 6.2.7 节）
- ☐ 尿嘧啶（见 6.2.7 节）
- ☐ 9cm 塑料培养皿，细菌学培养级别
- ☐ 15ml 离心管
- ☐ 包被了多聚-L-鸟氨酸和层粘连蛋白的培养板和培养皿（见 6.2.8 节）

步骤

（a）用 1ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液收获 EC 干细胞，使之形成单细胞悬液，按前述方法计数细胞。

（b）为了诱导细胞分化，每个 9cm 的培养皿接种 5×10^5 个细胞，加入 10ml 生长培养基。

（c）维持悬浮培养 24h 后，加入视黄酸，使其终浓度为 10μmol/L。

（d）将细胞继续培养 2 周，每 3～4 天更换一次含有视黄酸的培养基。培养第一周，会形成细胞的悬浮聚集体（图 6.9）。用新的培养基重悬细胞之前，必须轻缓地以 20*g* 的速度离心 2min 沉淀聚集体。

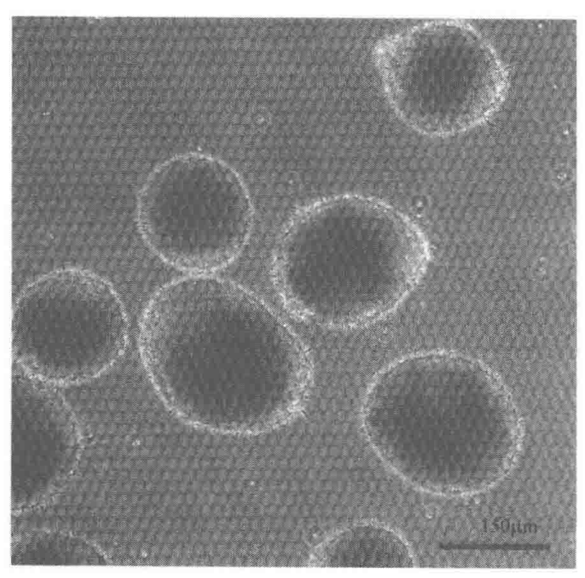
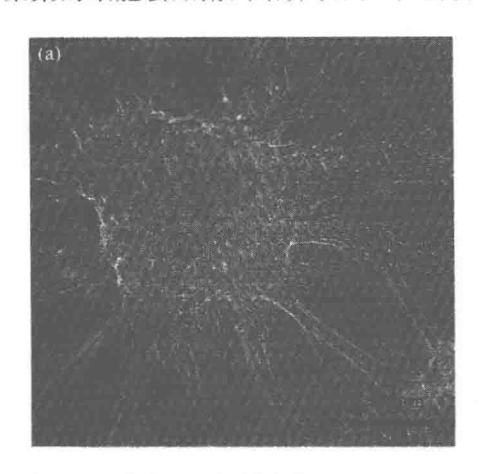


图 6.9　分离的人 EC 干细胞以悬浮的方式生长，在 10μmol/L 视黄酸存在的条件下 4～7 天内细胞聚集体形成。比例尺：150μm

(e) 将细胞悬液转移到 15ml 的离心管中，20g 离心 2min 轻缓地沉淀细胞聚集体。用不含视黄酸的生长培养基将细胞重悬，接种到包被过多聚-L-鸟氨酸（10μg/ml）和层粘连蛋白（10μg/ml）的基质上。

(f) 将细胞在含有有丝分裂抑制剂的生长培养基中继续培养 2～3 周［1μmol/L 阿糖胞苷（只在开始 10 天添加），10μmol/L 氟脱氧尿苷，10μmol/L 尿嘧啶］。在此期间，聚集的细胞会贴附到培养表面，大部分会发育出外展的神经突（图 6.10，彩图 7）。



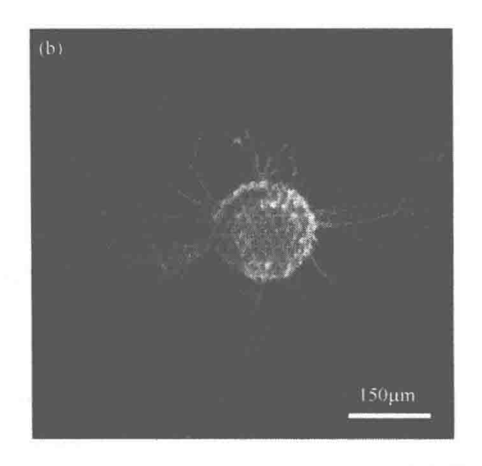


图 6.10 接种在包被过多聚-L-鸟氨酸和层粘连蛋白表面的未分化人 EC 细胞的悬浮聚集体，常有精巧的神经突起长出，相差显微镜下所见图像（a）和神经标志分子 TuJ-1 的免疫荧光染色图像（b）。比例尺：150μm（见彩图 7）

注意： 每次更换培养基为防止细胞贴附于培养表面时，要使用一个新的细菌培养皿。细胞聚集体的直径大约 50～750μm，肉眼可见，因此要挑选单个聚集体并在不同条件下（例如，与其他相邻聚集体或与其他类型的细胞共培养）培养就相当容易了。

6.5 低温保存

当细胞系建立起来，具备了 EC 干细胞的典型特征，并且没被污染，就可以低温保存了。可以通过这种方式来保存 EC 干细胞，并且复苏的细胞活性良好。

方案 6.9 EC 干细胞的冻存

试剂和材料

无菌或无菌准备

☐ EC 干细胞培养物，25cm^2 或 75cm^2（见方案 6.2）

☐ 冻存液（见 6.2.3 节）

非无菌

☐ 用于冻存的绝热箱

☐ －70℃冰箱

□ 液氮罐或替代物

步骤

(a) 按前述方法（见方案 6.4）收获细胞，450g 离心 3min。
(b) 弃掉上清，用冻存液将细胞重悬（每个 75cm² 培养瓶加 3ml，25cm² 培养瓶加 1ml）。
(c) 每个冷冻管中分 1ml 细胞悬液。
(d) 在冷冻管上标记好细胞系的名称、传代次数和日期。
(e) 将冷冻管放到绝热盒中再转移到－70℃冰箱中使其慢冻。
(f) 第二天早上将样品转移到长期保存的容器中，－140℃（机械冷冻器）或－196℃（液氮）中保存。
(g) 保证记录精确并随时更新。

方案 6.10　冻存的 EC 干细胞的复苏

试剂和材料

无菌
□ 生长培养基（见 6.2.1 节）
非无菌
□ 37℃水浴

步骤

(a) 将细胞从冷冻储存设备中取出，转移到便携式液氮筒。
(b) 将冷冻管放在 37℃水浴中快速融化。
(c) 将冻存管中的细胞悬液转移到 15ml 的离心管中，加 10ml 37℃的生长培养基。
(d) 450g 离心 3min，弃掉上清。
(e) 用 20ml 生长培养基重悬细胞，平分到两个 25cm² 培养瓶中。
(f) 将细胞培养过夜，第二天检查，更换培养基。
(g) 更新记录，显示细胞已从冻存设备中取出。

6.6　材料来源

项　目	目录号	公　司
冰醋酸	A 6283	Sigma
两性霉素 B	A 2942	Sigma
BioMag 磁粒，抗小鼠 IgM 磁粒（用于识别 SSEA-3 的 IgM 独特型）		Polysciences
Bouin's 溶液	HT-10-1-32	Sigma

续表

项　目	目录号	公　司
阿糖胞苷	C 1768	Sigma
DMEM	D 5671	Sigma
DMSO	D 2650	Sigma
胎牛血清	10106	Invitrogen
氟脱氧尿苷	F 8791	Sigma
甲醛	F 1635	Sigma
直径 3mm 的玻璃珠	71013	Merck Biosciences
谷氨酰胺	G 7513	Sigma
环己二乙酰胺（HMBA）	H 6260	Sigma
卡那霉素	K 0129	Sigma
层粘连蛋白，人，胎盘	L 6274	Sigma
圆底微量滴定板	163320	Nunc（现在是 Fisher）
多聚甲醛	P 6148	Sigma
青霉素/链霉素	15140	Invitrogen
苦味酸	925-40	Sigma
多聚-D-赖氨酸	P 7280	Sigma
多聚-L-鸟氨酸	P 5666	Sigma
全反视黄酸	R 2626	Sigma
SSEA-3 抗体		Developmental StudiesHybridoma Bank
STO 转化的小鼠胚胎细胞	86032003	ECACC
胰蛋白酶，0.25%（1∶250 级别）；1mmol/LEDTA · 4Na	25200	Invitrogen
尿嘧啶	U 3003	Sigma

（邓婷婷　译）

参 考 文 献

Andrews PW. (1982). Human embryonal carcinoma cells in culture do not synthesize fibronectin until they differentiate. *Int. J. Cancer* **30**:567–571.

Andrews PW. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.* **103**:285–293.

Andrews PW, Casper J, Damjanov I, Duggan-Keen M, Giwercman A, Hata J, von Keitz A, Looijenga LH, Millan JL, Oosterhuis JW, Pera M, Sawada M, Schmoll HJ, Skakkebaek NE, van Putten W, Stern P. (1996). Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. *Int. J. Cancer* **66**:806–816.

Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Fogh J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab. Invest.* **50**:147–162.

Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Dignazio M. (1985). A pluripotent human stem-cell clone isolated from the TERA-2 teratocarcinoma line lacks antigens SSEA-3 and SSEA-4 in vitro, but expresses these antigens when grown as a xenograft tumor. *Differentiation* **29**:127–135.

Andrews PW, Przyborski SA and Thomson JA. (2001). Embryonal Carcinoma Cells as Embryonic Stem Cells. In: Stem Cell Biology, Cold Spring Harbor Press, Monograph 40.

Cooke MJ, Stojkovic M, Przyborski SA. (2006). Growth of teratomas derived from human pluripo-

tent stem cells is influenced by the graft site. *Stem Cells Dev.* **15**:254–259.

Damjanov I, Solter D. (1974). Embryo-derived teratocarcinomas elicit splenomegaly in syngeneic host. *Nature* **249**:569–571.

Fogh J, Trempe G. (1975). New human tumour cell lines. In Human tumour cells in vitro (ed. Fogh J), pp. 115–159. Plenum Press, New York.

Freshney, R.I. (2005). Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, Hoboken, p.361.

Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* **94**:253–262.

Horrocks GM, Lauder L, Stewart R, Przyborski SA. (2003). Formation of neurospheres from human embryonal carcinoma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**: 411–416.

Illmensee K, Mintz B. (1976). Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:549–553.

Kleinsmith LJ, Pierce GB. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res. 24*:1544–1552.

Macpherson PA, McBurney MW. (1995). P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. *Methods* **7**:238–252.

Martin GR, Evans MJ. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1441–1445.

McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, Craig J. (1988). Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.* **8**:1063–1073.

Papaioannou VE, McBurney MW, Gardner RL, Evans MJ. (1975). Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* **258**:70–73.

Pera MJ, Cooper S, Mills J, Parrington JM. (1989). Isolation and characterisation of a multipotent clone of human embryonal carcinoma-cells. *Differentiation* **42**:10–23.

Pierce GB, Verney EL, Dixon FJ. (1957). The biology of testicular cancer. I. Behaviour after transplantation. *Cancer Res.* **17**:134–138.

Pleasure SJ, Page C, and Lee VM. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* **12**:1802–1815.

Przyborski SA. (2001) Isolation of human embryonal carcinoma stem cells by immunomagnetic sorting. *Stem Cells* **19**:500–504.

Przyborski SA. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* **23**:1242–50.

Przyborski SA, Christie VB, Hayman MW, Stewart R, Horrocks GM. (2004). Human embryonal carcinoma stem cells: models of embryonic development in humans. *Stem Cells Dev.* **13**:400–408.

Przyborski SA, Morton IE, Wood A, Andrews PW. (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur. J. Neurosci.* **12**:3521–3528.

Stevens LC, Little CC. (1954). Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**:1080–1087.

Stewart R, Christie V, Przyborski SA. (2003). Manipulation of human pluripotent embryonal carcinoma stem cells and the development of neural subtypes. *Stem Cells* **21**:248–256.

Thompson S, Stern PL, Webb M, Walsh FS, Engstrom W, Evans EP, Shi WK, Hopkins B, Graham CF. (1984). Cloned human teratoma cells differentiate into neuron-like cells and other cell types in retinoic acid. *J. Cell Sci.* **72**:37–64.

第7章 脐带和脐血来源干细胞的培养

YOUNG-JIN KIM
Biomedical Research Institute, LifeCord Inc., # B2-147, Ajou University Hospital, 5 San, Wonchon-dong, Youngtong-gu, Suwon 442-721, Korea, jin@lifecord. co. kr

7.1　背景介绍

骨髓（bone marrow，BM）移植已经是恶性血液病（如白血病）或致死的代谢性疾病的成熟治疗方法。成人骨髓单核细胞（mononuclear cells，MNCs）中含有造血干细胞（hematopoietic stem cell，HSCs）和骨髓基质细胞或间充质干细胞（marrow stromal cell or mesenchymal stem cell，MSCs），前者建立了体内的血液和免疫系统，后者在特殊微环境下能分化成不同类型的细胞谱系。

脐带血（umbilical cord blood，UCB）是出生后脐带（umbilical cord，UC）和胎盘中的血液。这在过去一直被认为是医疗废物而废弃。然而，近年来逐渐认识到 UCB 是 HSCs 和其他干细胞的一个重要来源，还具有操作和伦理的优势。从 1988 年第一例 UCB 移植治疗范可尼贫血（Fanconiamemia）的儿童后，由于其低病毒接触，在 1～2 个 HLA 位点不匹配的无关供者移植时严重 GVHD 的发生率降低，而骨髓移植则需要严格的供、受者组织相容性匹配，UCB 移植已成为一种安全和可接受的 HSC 移植模式。

除了 HSCs，UCB 还含有其他干细胞，如 MSCs，它具有分化成多种其他类型细胞的潜能，能用于人体内损伤细胞和组织的修复。

在人胚胎发育早期，妊娠 26 天时脐带开始形成。它是胎儿和胎盘之间连接的生命线。UC 正常情况下包含 2 条脐动脉和 1 条脐静脉，脐静脉是脐血的主要容器。这些血管埋在疏松的富含蛋白多糖的基质中，又叫做 Wharton's jelly（WJ）。最早在 1656 年由 Wharton 描述了这种胶质［Wharton，1996］，它的物理性质类似于聚氨酯垫，主要作用是保护连接胎盘和胎儿的重要血管生命线。最近，从脐静脉和 WJ 中叶分离得到了干细胞［McElreavey et al.，1991；Naughton et al.，1997；Purchio et al.，1999；Romanov et al.，2003］。

7.1.1　脐带来源干细胞

现在，人们已经从脐静脉和 WJ 中分离到了脐带来源干细胞。Romanov 等［2003］报道 MSC 样细胞存在于人脐静脉血管内皮下层，能够用常规方法分离、培养和扩增。人脐静脉来源的 MSC 样细胞的形态学研究和免疫表型鉴定结果显示这些细胞与骨髓和其他组织中得到的 MSCs［Campagnoli et al.，2001；Deans and Moseley，2000；Erices et al.，2000；Minguell et al.，2000；Zuk et al.，2001］非常相似。Sarugaser 等［2005］也报道了原来废弃或不能特异分离的人脐带血管周围细胞（human umbilical cord

perivascular，HUCPV）中也含有具有功能性间质表型的细胞。

McElreavey等［1991］报道了Wharton's jelly是MSCs的另一个潜在的来源。因此，Naughton等［1997］和Purchio等［1999］从脐带WJ中分离到“前软骨细胞”(prechondrocytes)，Mitchell等［2003］用类似的方法从WJ中分离到了成纤维样细胞，这些细胞能被诱导分化为神经样细胞。

7.1.2 脐血来源干细胞

脐血中除了HSC，还存在其他类型干细胞，如MSCs、非限制性体干细胞（unrestricted somatic stem cells，USSCs）、脐血来源胚胎样干细胞（cord blood-derived embryonic-like stem cells，CBEs）和脐血多潜能前体细胞（cord blood multipotent progenitor cells，CB-MPCs），已经在不同的生长条件下得到分离并进行了特性鉴定。普遍认为脐血来源的细胞较骨髓来源的更加原始，因此脐血来源的干细胞是细胞治疗、再生医学和组织工程的更加理想细胞来源。

7.1.2.1 造血干细胞（hematopoietic stem cells，HSCs）

迄今已经证实了脐带血是HSCs的一个重要来源，十多年累积的移植结果显示脐血是骨髓以外的另一个有效选择。脐血中的HSCs含量少，是一个不均一的不成熟造血前体细胞群体，含量大约在10^{-4}～10^{-5}，具有多能性，能分化成所有10或11个有功能的造血谱系的细胞。这些HSCs通过它们的多分化潜能和长期重建能力，在生命过程中能够重建整个造血系统［Martin-Rendon and Watt，2003a，b］。与骨髓和动员的外周血相比，脐带血含更高质量的原始HSCs，有更强的增殖潜能及相关的生命周期，以及更长的端粒［Migliaccio et al.，1986；Szilvassy et al.，2001；Vaziri et al.，1994；Zanjani et al.，1993］。

7.1.2.2 间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）

骨髓来源的骨髓基质细胞含有一个细胞亚群，能够分化为多种组织类型细胞，如骨、软骨、肌腱、肌肉、脂肪和支持造血细胞分化的间质结缔组织。许多研究已经确定了基质细胞的分离，扩增和体内外分化条件。这些细胞具有增殖和分化为间质系细胞潜能，因此命名为骨髓基质细胞或间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）。MSCs的分离主要依赖其贴塑料壁生长，培养基和生长因子相关的特殊培养条件。到目前为止，MSCs最常见的还是骨髓来源的，但从患者抽骨髓是一个损伤性操作，另外骨髓来源的MSCs随年龄的增长其分化潜能也会下降。因此，研究其他来源的MSCs已经成为新的热点。最近，已经从不同的来源分离出MSCs，其中包括脐血［Bieback et al.，2004；Erices et al.，2000；Goodwin et al.，2001；Javajon et al.，2004；Lee et al.，2004a；Lee et al.，2004b；Rosada et al.，2003；Yang et al.，2004］。虽然有些研究者不能从脐血中分离出MSCs，但最近有许多研究报道了从脐血成功分离出具有多系分化能力的MSCs，这些细胞能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和神经细胞。

7.1.2.3　非限制性体干细胞（unrestricted somatic stem cells，USSCs）

最近，Kögler 等［2004］从脐血中鉴定出少量 CD45 和 HLA II 类分子阴性的干细胞群体，命名为非限制性体干细胞（unrestricted somatic stem cells，USSCs），这些细胞在体外显示出很强的增殖能力，同时未见自发分化，但具备在诱导条件下可分化为多种组织类型细胞的内在潜能，包括向中胚层、内胚层和外胚层细胞分化。与骨髓来源的 MSCs［Pittenger et al.，1999］相比，USSCs 有更广的分化潜能，在免疫表型［Deans and Moseley，2000］和 mRNA 表达谱方面也具有差异。

7.1.2.4　脐血来源胚胎样干细胞（cord blood-derived embryonic-like stem cells，CBEs）

McGuckin 等报道了从脐血中分离出可重复培养的未转化的贴壁的人干细胞群体，具有胚胎干细胞的表型，命名为脐血来源胚胎样干细胞（cord blood-derived embryonic-like stem cells，CBEs）［Forraz et al.，2004；McGuckin et al.，2004］。CBEs 能形成类胚体样集落，对人原始胚胎干细胞特异性基因有免疫反应性［Gerrard et al.，2005；Martin et al.，2004］。因此 McGuckin 等［2004］提出了 CBEs 具有分化为神经、肝脏和胰腺细胞、骨、脂肪、骨骼肌和血管的能力。

7.1.2.5　脐血来源多能祖细胞（cord blood-derived multipotent progenitor cells，CB-MPCs）

我们研究组研究了新鲜或冻存的脐带血中是否存在其他干细胞，例如 MSCs。我们从人脐带血已经发现的干细胞群体中分离出一个新的细胞群体，这个群体的细胞具有与 HSCs 和 MSCs 不同的生物学特性。在适当的培养条件下，UCB-MNCs 接种后能够形成贴壁的细胞集落。在 3～4 周的培养周期中，这些集落逐渐形成贴壁的单层细胞，呈均一的成纤维细胞样形态和免疫表型，有高增殖潜能，这些细胞就被定义为脐血来源多能前体细胞（CB-MPCs）。CB-MPCs 能够分化成不同胚层的细胞类型，包括成骨细胞、内皮细胞、肝细胞和神经细胞。神经分化细胞表达细胞特异性分子，如酪氨酸羟化酶（多巴胺能神经元）、乙酰胆碱酶（乙酰胆碱能神经元）和谷氨酸脱羧酶（GABA 能神经元），提示 CB-MPCs 能分化为功能特异性的神经元［结果未发表］。

7.2　培养基和试剂的制备

7.2.1　培养基

7.2.1.1　脐带运输培养基

Eagle 基础培养基（EBM），添加 300U/ml 青霉素，300μg/ml 链霉素，150μg/ml 庆大霉素和 1μg/ml 两性霉素 B。

7.2.1.2　MSCs 培养基

含 2mmol/L 的左旋谷氨酰胺的低糖 DMEM（LG-DMEM），添加 10%热灭活胎牛

血清（FBS），100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素

7.2.1.3 用于造血干细胞的 IMDM

含 2mmol/L 的左旋谷氨酰胺的 IMDM，添加 1%牛血清白蛋白，10μg/ml 胰岛素，0.1mmol/L 2-巯基乙醇，50U/ml 青霉素和 50μg/ml 链霉素

7.2.1.4 用于造血干细胞和 MSCs 共培养的 IMDM

IMDM 添加 10%热灭活 FBS，100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素

7.2.1.5 用于脐带血来源多能祖细胞的 DMEM

含 2mmol/L 的左旋谷氨酰胺的高糖 DMEM（HG-DMEM），添加 10%热灭活胎牛血清（FBS），100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 100ng/ml 粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子（GM-CSF）。

7.2.1.6 用于脐血来源胚胎样干细胞的 IMDM

IMDM 添加 10%热灭活 FBS，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 TPOFLK 细胞因子混合物：血小板生成素（10ng/ml），Flt-3 配体（50ng/ml）和 c-kit 配体（20ng/ml）。

7.2.1.7 用于非限制性体干细胞的起始培养基

含 2mmol/L Ultraglutamine 的 LG-DMEM，添加 30%热灭活 FBS，100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素。

7.2.2 试剂

7.2.2.1 缓冲液

PBSA：Dulbecco's PBS 溶液 A（无钙镁离子）

过柱缓冲液：pH7.2 的 PBSA，添加 0.5%牛血清白蛋白和 2mmol/L EDTA 或 0.6%枸橼酸葡萄糖 A 方（ACD-A；见 7.5 节）。用真空装置除去缓冲液中的气体。

ACD-A：枸橼酸葡萄糖 A 方（0.6%ACD-A）和 0.5%的牛血清白蛋白（第 V 组分）（见 7.5 节）。

7.2.2.2 酶

胶原酶 A，0.1%用 PBSA 配制

胰蛋白酶，0.05%胰蛋白酶用 PBSA 配制，含 0.53mmol/L EDTA；2.5%胰蛋白酶用 PBSA 配制。

7.2.2.3 抗凝血剂

枸橼酸葡萄糖腺苷（CPDA-1）：122mmol/L（26g/L）枸橼酸钠，0.142mol/L

(25.5g/L) 葡萄糖，15.6mmol/L (3.0g/L) 枸橼酸和 18.3mmol/L (2.2 g/L) 磷酸二氢钠。

7.3 具体方案

7.3.1 脐带和脐血的准备

在有胎盘的哺乳动物中，脐带是把发育的胚胎或胎儿与胎盘连接的管道。脐带从无脐带 (achordia) 到 300cm 长度变化很大，直径最大到 3cm。脐带在生理状态下是螺旋状的，大约有 380 个螺旋。6%的脐带短于 35cm，而 94%的脐带长度大于 80cm。它包含了较大的动脉和静脉（明显可见 2 条脐动脉和 1 条脐静脉包裹在 Wharton 胶中），用于胚胎和胎盘血液之间交换富含营养物质及氧气。出生后位于新生儿腹部的脐带残端几天后就干枯脱落，仅留下一个小疤痕（脐）[Robinson，2000]。

在产妇知情同意后，根据伦理委员会通过的指导原则，进行人脐带和脐血的收集。经阴道或剖腹产分娩后，应尽快进行脐血收集，最好是在出生后 10min 以内。为了得到最大体积的脐血，建议最好在子宫内收集脐血（胎盘还在子宫内时），而不是在子宫外（在婴儿分娩随后的胎盘剥离后）。子宫内收集也适合在不复杂的剖腹产中进行。收集脐血必须遵守以下原则：①不影响分娩方式；②不增加婴儿或产妇发生不良反应可能性；③不妨碍对婴儿或产妇进行的正常治疗，包括收集脐血样本用于诊断 [Galanakis et al.，2003]。

方案 7.1　脐带的准备

试剂与材料

灭菌

☐ 运输培养基：(见 7.2.1.8 节)
☐ 夹子
☐ 剪刀

步骤

(a) 出生后，用两个夹子在近新生儿的末端和近胎盘的末端夹住脐带以封闭脐带；
(b) 剪下两个夹子间的脐带，一端在接近新生儿处，另一端剪去胎盘；
(c) 剪下脐带后放入运输培养基中送去实验室，整个处理过程在 6～12h 内。

方案 7.2　脐带血的准备：袋或注射器法

试剂与材料

灭菌

☐ 抗凝剂：CPDA-1 (见 7.2.2.3 节)

☐ Betadine* 或 70%乙醇
☐ 夹子
☐ 18 号注射器针头
☐ 脐血收集袋，175ml，含 24.5ml CPDA-1
☐ 50ml 注射器，含 200I. U. 肝素
* 贝培定，一种聚维酮-碘制剂（povidone-iodine）——译者注）

步骤

(a) 夹住脐带，尽可能靠近新生儿处剪断脐带。

(b) 用 Betadine 或 70%酒精的棉花擦拭针头插入位点，位点在脐带近胎儿末端。

(c) 为了收集到最大量的脐血，脐带的处理动作要尽可能小。

(d) 接着用收集袋或 50ml 注射器的针头插入步骤 b 中处理好的脐静脉插入位点。

(e) 将收集袋保持在低于插入位点水平，以利于脐血在重力作用下流入容器中，或者用 50ml 注射器缓慢地将脐血从脐静脉内抽出。尽量多地收集脐血，一般能收集到 60～150ml。

(f) 如果出现静脉滑脱，可沿脐带稍向上处用 Betadine 或 70%乙醇消毒后重新插入针头。

(g) 血流停止后，打开针头安全帽，将它推入锁定位置。注意：脐血应该保存于室温，不要冷藏。

(h) 如果使用袋装，用附带的卡环夹住管子，尽可能接近血袋处打两个安全结以防止泄露，然后剪去针头，将针头放入尖头容器中丢弃。

(i) 轻轻转动血袋或注射器几次，使脐血与抗凝剂充分混合。

7.3.2　从脐带中制备干细胞

Romanov 等［2003］从脐静脉内皮下层中分离培养出 MSCs 样细胞，不表达内皮或白细胞特异性抗原，而表达 α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）和部分间质细胞的标志分子。WJ 来源的干细胞是间质细胞的一个潜在来源，已经报道通过种植法［Naughton et al., 1997；Purchio et al., 1999］或酶消化法［Mitchell et al., 2003］获得分离和培养。

方案 7.3　从脐静脉分离干细胞

试剂与材料

灭菌

☐ 培养基：完全 LG-DMEM（见 7.2.1.2 节）
☐ PBSA
☐ 胰蛋白酶，0.05%，含 EDTA（见 7.2.2.2 节）

☐ 胶原酶（见 7.2.2.2 节）
☐ 培养瓶
☐ 导管

步骤

(a) 在正常分娩后 6～12h 内收集和处理脐带。
(b) 在脐静脉内插入导管，用 PBSA 完全地洗 2 次。
(c) 夹住远端脐带。
(d) 用 0.1%胶原酶溶液充满静脉。
(e) 夹住近端脐带。
(f) 将脐带在 37℃孵育 20min。
(g) 轻轻按摩脐带，收集含有内皮和内皮下层细胞的悬浮液，600g 离心 10min。
(h) 用培养基重悬细胞。
(i) 计数后，按 1×10^3 个细胞/cm^2 的密度将细胞接种到 75cm^2 的培养瓶中。
(j) 3 天后更换培养基，除去未贴壁细胞，保留贴壁的细胞继续培养，每 3 天更换一次新鲜培养基，至大约 2 周后可见成纤维样细胞生长。
(k) 在这种情况时，用 0.05%胰蛋白酶/EDTA 收集细胞，传代到新培养瓶中继续扩增。

方案 7.4　种植法从 Wharton 胶中分离干细胞

试剂与材料

灭菌
☐ 培养基：完全 LG-DMEM（见 7.2.1.2 节）
☐ PBSA
☐ 剪刀
☐ 镊子

步骤

(a) 正常分娩后获得脐带，保存在 PBSA 中，1～24h 内处理标本。
(b) 去除血管，将 Wharton 胶切成小块。
(c) 将种植块转移到加有 DMEM/FBS 的 6 孔板中。
(d) 将培养板静置 5～7 天，使细胞从种植块中爬出后再更换培养基（图 7.1；彩图 8）。

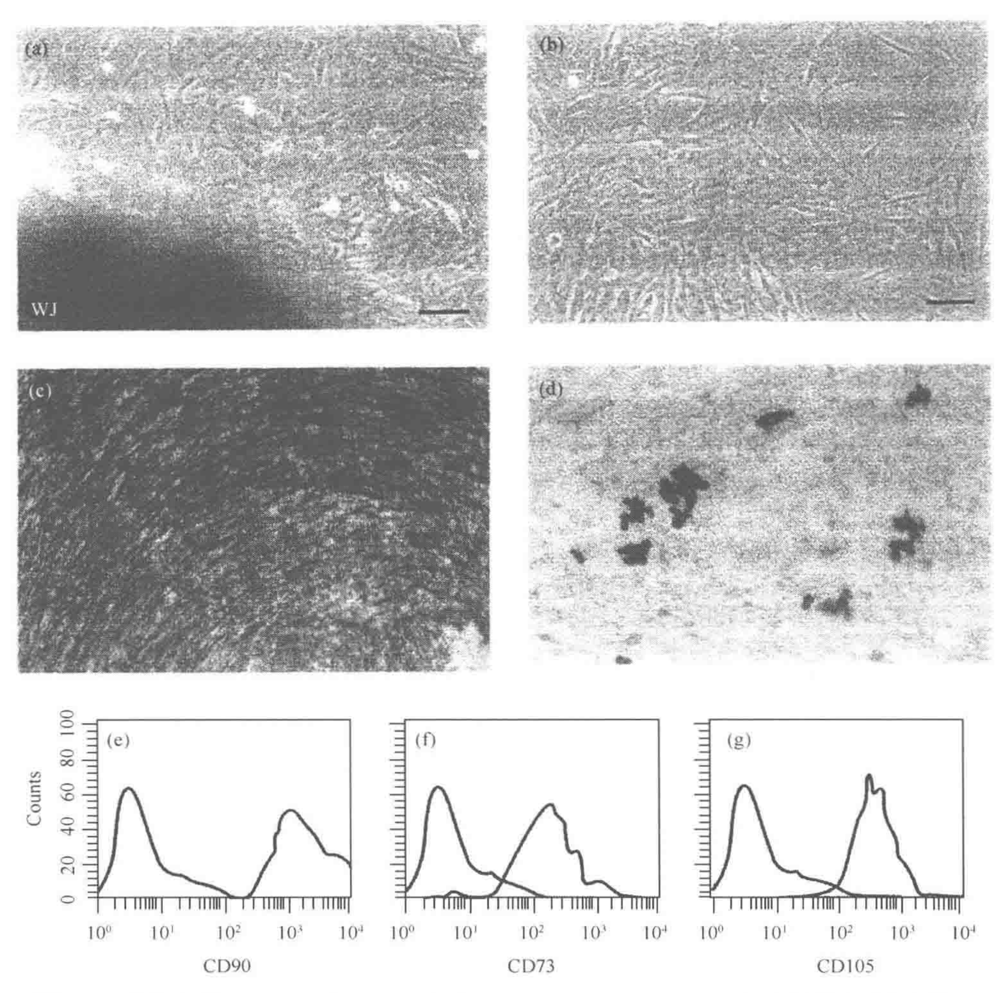


图 7.1　种植法从 Wharton 胶（WJ）中分离得到的干细胞显微镜照片和细胞表面标记分子
(a) 原代 WJ 干细胞的显微照片。(b) 第二代传代培养的细胞。标尺为 100μm。(c) Von Kossa 染色鉴定成骨分化。(d) 油红 O 染色鉴定成脂分化（参见彩图 8）。(e～g) 流式细胞仪分析原代 WJ 来源干细胞的细胞表面标记分子。同型对照在图中用细线表示。

方案 7.5　酶消化法从 Wharton 胶中分离干细胞

试剂与材料

灭菌

☐ 培养基：完全 LG-DMEM（见 7.2.1.2 节）
☐ PBSA
☐ 胶原酶（见 7.2.2.2 节）
☐ 胰蛋白酶，2.5%（见 7.2.2.2 节）
☐ 培养瓶
☐ 圆锥形离心管，50ml

□ 剪刀
□ 镊子

步骤

(a) 脐带取材后，可在 PBSA 中保存 1～24h。
(b) 除去血管，将 Wharton 胶剪成大约 0.5cm 的小组织块。
(c) 将剪碎的组织块转移到 50ml 离心管，用无血清 DMEM 洗，室温 250*g* 离心 5min。
(d) 倒掉上清液，将离心后的沉淀物拍散，浸泡在 0.1%胶原酶（大约是沉淀物体积的 3 倍）中，37℃消化 16～18h。
(e) 加入适当体积的 PBSA（消化液体积的 2 倍），室温 250*g* 离心 5min。
(f) 倒掉上清液，加 2.5%胰蛋白酶（大约是沉淀物体积的 2 倍）37℃处理 30min，轻轻搅动。
(g) 加入适当体积的 FBS（消化酶体积的 10%）中止胰蛋白酶作用。
(h) 用培养基洗。
(i) 用培养基重悬分离得到的细胞，按大约 1×10^3 细胞/cm^2 密度将细胞接种到培养瓶中。

7.3.3 从脐血中分离干细胞

脐带血（UCB）中富含造血干细胞（HSCs），在实际操作和伦理问题上都是造血干细胞的一个很好来源。HSCs 是指原始未分化的具有自我更新和分化成所有造血细胞类型潜能的细胞。大部分 HSCs 表达 CD34 抗原，一个 90～120kDa 大小的内在膜糖蛋白，参与调节造血细胞与微环境中基质细胞的黏附。因此，HSCs 主要是通过抗 CD34 抗体的作用进行分离。此外在不同的培养条件下已经从新鲜或冻存的 UCB 中，分离到含有 CB-MSCs、USSCs、CBEs 和 CB-MPCs 的不同干细胞群体。

方案 7.6 密度梯度分离法分离单个核细胞（MNCs）

试剂与材料

灭菌
□ 合适的培养基（见 7.2.1.2～7.2.1.6 节）或冷冻液（见方案 7.7）
□ PBSA
□ Ficoll-Hypague（密度 1.077g/L）
□ 巴氏吸管
□ 50ml 离心管

步骤

(a) 将脐血样品用 PBSA 按 1∶1 比例稀释。

(b) 将 15ml Ficoll-Hypague 吸入 50ml 离心管。

(c) 将 30mlPBSA 稀释的脐血样品缓慢地加到 Ficoll-Hypague 上。

(d) 室温 450g 离心 20～30min。

(e) 离心后，在 Ficoll-Hypague 液面上明显可见一层细胞，是密度低于 Ficoll-Hypague 液的单个核细胞层（见图 9.1 和彩版 13）。

(f) 用巴氏吸管，将单个核细胞层吸出，转移到另一离心管中。

(g) 用 PBSA 洗细胞，室温 200g 离心 10min。

(h) 倒掉上清，用 PBSA 重悬细胞，洗细胞，重复上述步骤 (g)。

(i) 最后，用合适的培养基重悬细胞（冰冻液或培养基）。

方案 7.7 CB-MNCs 冻存

试剂与材料

灭菌

☐ FBS

☐ 二甲基亚砜（DMSO）

☐ 冻存管

☐ 慢速冷冻盒（如 Mr. Frosty 程序降温盒）或控速降温仪

☐ 耐液氮储存盒

步骤

(a) 准备冻存液：90%FBS+10%DMSO；放冰上或 4℃冰箱冷却，至少 30min。

(b) CB-MNCs 细胞计数。

(c) 用冷的冻存液重悬细胞，调整细胞浓度为 (5～10)×10^6活细胞/ml。

(d) 按 1ml/冻存管分装。

(e) 立即将冻存管放入慢速冷冻盒，置于－70℃冰箱 4～24h。或者将冻存管放入液氮的控速降温仪中。

(f) 4～24h 后，将置于－70℃冰箱或控速降温仪中的冻存管放入耐液氮储存盒，将此盒放入液氮罐的气相（大约－135℃）或液相（大约－196℃）中。

方案 7.8 CB-MNCs 的复苏

试剂与材料

灭菌

☐ 合适的培养基（见 7.2.1.2～7.2.1.6 节）添加 10% FBS

☐ PBSA

☐ 70%乙醇

☐ 水浴

步骤

(a) 将装有CB-MNCs的冻存管移入37℃水浴中。

(b) 先擦干冻存管，然后用70%酒精擦拭冻存管防止污染，打开冻存管。

(c) 迅速将细胞悬液（大约1ml）转移到装有10ml预冷的10%FBS培养基的15ml离心管中。

(d) 室温200*g*离心10min。

(e) 倒掉上清，不搅动离心沉淀的细胞团。

(f) 用10ml PBSA洗一次，室温200*g*离心10min。

(g) 根据实验目的，用合适的培养基重悬CB-MNC。

方案7.9 从CB-MNCs中分离CD34^{+}细胞

试剂与材料

灭菌

☐ 培养基
☐ 过柱缓冲液（见7.2.2.1节和7.5节）
☐ FcR阻断剂（见7.5节）
☐ CD34微球（见7.5节）
☐ 柱子（MS+/RS+或LS+/VS+）（见7.5节）
☐ 磁珠细胞分离仪（如MiniMACS；见7.5节）
☐ 尼龙过滤网，30μm

步骤

(a) 准备过柱缓冲液，用抽真空装置去除气体。

(b) 每10^8个CB-MNCs用终体积300μl缓冲液重悬。

(c) 每10^8个CB-MNCs悬液加100μl FcR阻断剂，抑制CD34微珠非特异性结合或通过Fc受体介导与非靶细胞的结合。

(d) 每10^8个CB-MNCs悬液加100μl CD34微球进行细胞标记，充分混匀后在6～12℃冰箱放置30min。

(e) 加PBSA洗，室温200*g*离心10min；加适量的缓冲液重选细胞。

(f) 根据CB-MNCs的细胞总数选择合适的柱子类型（MS+/RS+或LS+/VS+），将柱子放入MACs分离仪的磁场中。加入缓冲液润洗柱子（MS+/RS+：500μl；LS+/VS：3ml）。

(g) 用30μm的尼龙过滤网过滤细胞，去除细胞团。使用前，用缓冲液湿润柱子。

(h) 将细胞悬液加入柱子，使未结合的细胞通过柱子。

(i) 用缓冲液将未结合的细胞洗去（MS+/RS+：3×500μl；LS+/VS：3×3ml）。

(j) 洗脱结合的细胞：

(i) 将柱子从分离仪中移出。

(ii) 置于合适的管中。

(iii) 将柱子加满缓冲液（MS+/RS+：1 ml；LS+/VS：5 ml）。

(iv) 用柱子随带的内塞，加压将结合的细胞冲洗出来。

(k) 加 PBSA 将 $CD34^+$ 细胞洗一遍，室温 200g 离心 10min。用适当的培养基重悬细胞。

方案 7.10　体外扩增 $CD34^+$ 细胞

试剂与材料

灭菌

☐ 培养基；完全 IMDM（见 7.2.1.3 节）

☐ 细胞因子（Flt-3 配体，干细胞因子，促血小板生成素，IL-6）

☐ 培养瓶

步骤

(a) 用添加细胞因子的培养基重悬细胞（50 ng/ml Flt-3 配体，50 ng/ml 干细胞因子，20 ng/ml 促血小板生成素和 10 ng/ml IL-6）。

(b) 按 2×10^4 个细胞/ml 的细胞浓度将 $CD34^+$ 细胞接种到 T25 培养瓶中。

(c) 每周两次半量换液，补充细胞因子。

方案 7.11　饲养层细胞共培养体外扩增 $CD34^+$ 细胞

本方案摘自 Jang 等报道的方法 [2005]

试剂与材料

灭菌

☐ MSCs 培养基（见 7.2.1.2 节）

☐ 6 孔培养板

☐ 丝裂霉素 C，100μg/ml

☐ 共培养的培养基（见 7.2.1.4 节）

☐ 细胞因子（干细胞因子，IL-6，Flt-3 配体，促血小板生成素）

步骤

(a) 将脐带血来源的间充质干细胞（blood-derived mesenchymal stem cells，CB-MSCs）作为饲养层细胞，用 MSCs 培养基重悬 CB-MSCs，细胞浓度为 5×10^4 个细胞/ml（获得 CB-MSCs 的方法见方案 7.13）。

(b) 将 CB-MSCs 接种到 6 孔板。

(c) 每周两次半量更换新鲜培养基。

(d) 当 CB-MSCs 达到 90% 以上汇合时，用 10 μg/ml 丝裂霉素 C 处理，37℃ 2.5h。

(e) 用无血清 IMDM 将 CB-MSCs 洗两遍。

(f) 按 1×10^4/ml $CD34^+$ 细胞重悬于含细胞因子的共同培养基（100 ng/ml 干细胞因子，100 ng/ml IL-6，50 ng/ml Flt-3 配体，10 ng/ml 促血小板生成素）。

(g) 将 $CD34^+$ 细胞（见方案 7.9）接种到 CB-MSCs 饲养层细胞上。

(h) 每周两次更换 1/4 培养基。

(i) 2 周后，收集未贴壁细胞。

注意：BM-MSCs [Dexter et al.，1977；Da Silva et al.，2005]，人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVEC）[Yildrim et al.，2005] 和人胎盘来源的间质祖细胞（human placenta-derived mesenchymal progenitor cells）[Zhang et al.，2004] 也能作为饲养层细胞使用。

方案 7.12　体外三维（3D）基质中 $CD34^+$ 细胞的扩增

本方案摘自 Ehring 等报道的方法 [2003]

试剂与材料

灭菌

☐ 培养基（见 7.2.1.3 节）
☐ 细胞因子（Flt-3 配体，干细胞因子，IL-3 和 IL-6）
☐ 0.05%胰蛋白酶，含 EDTA（见 7.2.2.2 节）
☐ 48 孔培养板
☐ 纤维粘连蛋白（fibronectin）包被的细胞基质支架

步骤

(a) 用含细胞因子的培养基重悬细胞（100 ng/ml Flt-3 配体，100 ng/ml 干细胞因子，20 ng/ml IL-3 和 20 ng/ml IL-6）。

(b) 将 2.5×10^5 $CD34^+$ 细胞/ml 接种到纤维粘连蛋白包被的 48 孔培养板

(c) 每周两次半量更换新鲜培养基。

(d) 两周后收集细胞：

　(i) 250*g* 离心 10min，从 3D 细胞基质支架中收集非贴壁的细胞。

　(ii) 贴壁的细胞用 0.05%胰蛋白酶/EDTA 孵育细胞基质，37℃孵育 30min，随后 250*g* 离心 10min。

方案 7.13 脐血 MSCs 的分离

试剂与材料

灭菌

☐ 培养基（见 7.2.2.1 节）

☐ 0.05%胰蛋白酶，含 EDTA（见 7.2.2.2 节）

☐ PBSA

☐ T25 培养瓶

步骤

(a) 为了获得新鲜制备的 CB-MNCs，按方案 7.6 的步骤（a）～（i）分离 CB-MNCs。

(b) 用培养基重悬新鲜分离或冻存的 MNCs。冻存的 MNCs 在铺板前要 37℃迅速复苏并用培养基洗一遍。

(c) 将重悬在培养基的 CB-MNCs 接种到 T25 的培养瓶，接种密度为 3×10^5 个细胞/cm^2。

(d) 将细胞放入 37℃ 5% CO_2 的培养箱中。

(e) 每 7 天更换一次培养基，直到贴壁生长的成纤维细胞样的细胞达到汇合。

(f) 一旦达到汇合，用 0.05%胰蛋白酶/EDTA 处理 5min，重悬细胞，然后将细胞按 1×10^5 个/瓶重新接种。

(g) 达到细胞汇合后，用培养基按 1∶5 稀释后再次接种培养。

方案 7.14 非限制性体干细胞（unrestricted somatic stem cells，USSCs）的分离

本方案摘自 Kögler 等报道的方法［2004］

试剂与材料

灭菌

☐ 起始培养基（见 7.2.1.7 节）

☐ 扩增培养基（见 7.2.1.8 节）

☐ 0.05%的胰蛋白酶，含 EDTA（见 7.2.2.2 节）

☐ PBSA

☐ T25 培养瓶

步骤

(a) 制备和分离脐带血来源的 MNCs（CB- MNCs）（见方案 7.6）。

(b) 如果使用冻存的 CB-MNCs，复苏的细胞可以用于培养，不需要其他分离

步骤。

(c) 用起始培养基按 $5\times10^6\sim7\times10^6$ 个细胞/ml浓度接种到T25的培养瓶中。

(d) 将细胞在37℃，5% CO_2 的条件下培养，2～4周内每周一次更换培养基和细胞因子。

(e) 形成USSC集落后，在扩增培养基中扩增细胞。

(f) 将细胞在37℃，5% CO_2 的条件下培养。

(g) 到达80%汇合后，用0.05%胰蛋白酶/EDTA消化细胞，并按1∶3比例传代，在相同培养条件下继续培养。

方案7.15　脐血来源胚胎样干细胞（cord blood-derived embryonic-like stem cells，CBEs）的分离

本方案摘自McGuckin等报道的方法［2004］。

试剂与材料

灭菌

- ☐ 培养基（见7.2.1.4节）
- ☐ TPOFLK细胞因子混合物（10 ng/ml促血小板生成素，50 ng/ml Flt-3配体和20 ng/ml c-kit配体）
- ☐ ACD-A缓冲液（见7.2.2.1节）
- ☐ 小鼠抗人CD45、CD33、CD47单克隆抗体，抗血型糖蛋白A抗体，2%人丙种球蛋白（human gamma globulins，HAG。用PBSA溶解）
- ☐ 磁珠标记的人IgG4抗总小鼠IgG单克隆抗体（human IgG4 monoclonal anti-pan mouse IgG）
- ☐ 磁分离器，如Dynal Magnetic Particle Concentrator
- ☐ 0.05%胰蛋白酶，含EDTA（见7.2.2.2节）
- ☐ PBSA
- ☐ 6孔培养板

步骤

(a) 分离和制备CB-MNCs（见方案7.6）。

(b) 根据以下免疫磁珠分选的方法纯化原始系限制性干细胞。

(c) 用2% HAG处理MNCs，4℃放置20min。

(d) 用小鼠抗人CD45，CD33，CD7和抗血型糖蛋白A单克隆抗体标记MNCs，4℃标记30min。

(e) 用ACD-A缓冲液洗细胞，400*g*，4℃离心10min。

(f) 用ACD-A缓冲液再洗一遍。

(g) 用磁珠标记的人IgG4抗总小鼠IgG单克隆抗体标记MNCs 30min。

(h) 根据产品说明书用Dynal Magnetic Particle Concentrator分离系特异性分子阴

性（Lin⁻）的细胞群体。

(i) 按以下步骤安装细胞分离装置和硅酮管：

(i) 用 70%乙醇灌洗 10min。

(ii) 用水洗两遍，每次 5 min。

(iii) 用 5% BSA/PBSA 润洗。

(iv) 用弹簧夹夹住硅酮管的下段，用带子将硅酮管安全地固定在磁分离器中。

(j) 分离细胞前，用培养基加满细胞分离装置中的硅酮管，使通过柱子的流速控制在 5ml/min 以内。然后，用微量吸管将细胞/磁珠混合悬液加到管中，刚好低于液体的弯月面。

(k) 用巴氏吸管，不断添加培养基，防止管上的细胞脱水。

(l) 用 15ml 离心管收集流出的部分（含没有结合磁珠的细胞，Lin^- 细胞）。

(m) 用台盼蓝染色进行活细胞计数。

(n) 用含 TPOFLK 细胞因子混合物的培养基将 UCB 来源的 Lin^- 细胞接种到没有包被过的 6 孔培养板中，接种浓度为 2.7×10^4 个细胞/ml。

(o) 将细胞在 37℃，5% CO_2 的条件下培养，每周一次更换培养基和细胞因子。

(p) 必要时，用 0.05%胰蛋白酶/ EDTA 消化贴壁细胞，按 1×10^5 个细胞/ml 浓度接种到新培养瓶中，按上述条件继续培养细胞。

方案 7.16 脐血来源多能前体细胞（cord blood-derived multipotent progenitor cells，CB-MPCs）的分离

试剂与材料

灭菌

- ☐ 培养基（见 7.2.1.5 节）
- ☐ 0.05%胰蛋白酶，含 EDTA（见 7.2.2.2 节）
- ☐ PBSA
- ☐ T25 培养瓶

步骤

(a) 分离和制备脐血来源的 MNCs（见方案 7.6）。

(b) 如果使用冻存的 CB-MNCs，复苏的细胞可以用于培养，不需要其他分离步骤。

(c) 细胞复苏后在 30min 内，用台盼蓝染色进行活细胞计数。

(d) 将在培养基中的 CB-MNCs 接种到 T25 培养瓶中，接种密度为 3×10^5 个细胞/cm^2。

(e) 将细胞在 37℃，5% CO_2 的条件下培养，每 7 天更换一次培养基，连续培养 2～4 周。

(f) 去除培养基，用 PBSA 洗两次培养瓶。

(g) 用0.05%胰蛋白酶/EDTA处理，使贴壁细胞重悬，按1×10^6个细胞/瓶的密度重新接种。

(h) 细胞生长达到汇合后，按1∶3稀释后重新接种，在相同的培养条件下继续培养。

(i) 在培养过程中，用台盼蓝染色进行细胞计数，估计总细胞数。

7.4 脐带来源细胞的生物学特征

7.4.1 脐带来源干细胞

7.4.1.1 脐静脉

最初原代培养的细胞大多为内皮细胞（endothelial cells，ECs）成簇生长，呈典型的内皮细胞形态。但与标准的内皮细胞培养条件下（含10% FBS的M199）平行培养的细胞相比，10% FBS的DMEM培养的内皮细胞岛呈致密状，没有伸展、迁移或增殖。培养一周后，ECs间可见大量的成纤维细胞样细胞。接着，这些细胞形成集落，向外伸展，第三周时长成一层均一的成纤维细胞样（MSCs样）细胞，占据了整个塑料表面[Romanov et al., 2003]。

免疫表型上，该细胞群体为CD29，CD13，CD44，CD49e，CD54，CD90和HLA-class I均阳性，CD45，CD14，血型糖蛋白A（glycophorin A），HLA-DR，CD51/61，CD106和CD49d为阴性[Covas et al., 2003]。这些细胞能成脂和成骨分化。成脂诱导液中培养1周后，成脂分化开始出现，培养2周末时，细胞内出现大量油红O-阳性的脂肪小滴。类似的，将常规培养基换成成骨培养基后，大部分MSCs样细胞呈碱性磷酸酶阳性[Romanov et al., 2003]。

这些细胞体外低密度培养20代后仍保持其分化潜能不改变。当细胞高密度汇合后，细胞就失去了其复制能力，并出现细胞形态改变[Covas et al., 2003]。

7.4.1.2 脐带胶质（Wharton's Jelly）

从Wharton's jelly来源的干细胞呈成纤维细胞样表型。流式细胞仪分析显示细胞表达高水平的基质分子（CD44，CD105），整合素分子（CD29，CD51）和MSCs分子（SH2，SH3），但不表达造血系特异性分子（CD34，CD45）[Wang et al., 2004]。这些细胞能体外增殖培养80代以上[Mitchell et al., 2003].

用5-氮杂胞苷（5-azacytidine）处理或用心肌细胞条件培养基培养时，这些细胞能诱导分化成心肌细胞，表达心肌细胞特征性分子钙黏素（N-cadherin）和心肌肌钙蛋白（cardiac troponin I）。此外，这些细胞具有多系分化的潜能，在合适的生长条件下能分化为成脂、成软骨、成骨系细胞[Wang et al., 2004]。

7.4.2 脐血来源干细胞

7.4.2.1 造血干细胞（hematopoietic stem cells，HSCs）

HSCs的活力必须进行体内外两个方面确证。体外检测包括长期培养启动细胞

(long-term culture-initiating cells，LTC-1C）分析，鹅卵石区形成细胞（cobblestone area-forming cells，CAFC）分析，高增殖潜能集落形成细胞（high proliferative potential colony-forming cells，HPP-CFC）分析和原始细胞集落形成单位（colony-forming unit-blast，CFU-BL）分析［Heike et al.，2002］。体内检测方法为在非肥胖型糖尿病/重度联合免疫缺陷小鼠（nonobese diabetic/severe combined immunodeficient，NOD/SCID）植入分析，描述如下。6～8 周龄小鼠接受 270 cGy 的照射后，通过尾静脉注射移植 5×10^3扩增的细胞。移植后 10～12 周处死小鼠。收集股骨和胫骨，用含 5%FBS 的 PBSA 冲洗骨髓腔以释放骨髓细胞。细胞悬液经 40μm 细胞滤网过滤，除去细胞团和碎片，然后进行流式分析。移植后小鼠骨髓中含人来源的 $CD45^+$ 细胞＞0.1%，认为人来源的细胞植入［Leung et al.，2005］。

HSCs 含有一小群原始的多能干细胞，表达 $CD34^+$ 细胞表面分子，具有自我更新和生成髓系和淋系的定向祖细胞的能力。但是脐血中 HSCs 的数量是有限的。因此，脐血来源体外扩增的 HSCs［Astori et al.，2005；Flores-Guzman et al.，2002］或同时移植 2 份或 2 份以上脐血是用于造血干细胞移植的一个可行方案。

7.4.2.2　脐血来源 MSCs

冻存的脐血来源 MNCs 进行培养，4～7 天后可见不均一的细胞群体贴壁，包括圆形、纺锤形的细胞。这些细胞在原代培养时增殖缓慢，14～21 天到达细胞汇合。传代后，不均一的细胞群变成了均一的细胞群体，呈扁平、成纤维细胞样形态［Lee et al.，2004a］。

传 3 代后的脐血来源的细胞进行细胞表面抗原谱分析，并与培养前的脐血来源的 MNCs 部分进行比较。培养后，MNCs 的免疫表型谱明显改变成典型的 MSCs 免疫表型。培养的细胞为 MSCs 特异的表面分子如 CD105（SH2），CD73（SH3，SH4）和 CD166（ALCAM）强阳性，而 CD14（单核细胞抗原），CD31（内皮细胞抗原），CD34（HSCs 抗原），CD45（白细胞共同抗原）和 CD86（共刺激分子）为阴性。脐血来源的细胞表面抗原表达谱与骨髓来源 MSCs 的基本一致。

在体外传代前 6 代，脐血来源的 MSCs 具有高度的增殖能力，细胞数大约能扩增 1250 倍，从原代接种的一瓶细胞最少能扩增到 6.8×10^8个细胞。脐血来源细胞在早期传代时具备的这种快速扩增能力，使得这些细胞能够增殖到足够量的细胞供治疗使用，并且这些细胞还具有分化成神经细胞、成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的能力。

7.4.2.3　USSCs

USSCs 是一群贴壁生长、纺锤形的细胞，细胞大小为 20～25 μm。USSCs 不表达 CD14，CD33，CD34，CD45，CD49b，CD49c，CD49d，CD49f，CD50，CD62E，CD62L，CD62P，CD106，CD117，glycophorin A 和 HLA-DR。USSCs 表达高水平的 CD13，CD29，CD44，CD49e，CD90，CD105，波形蛋白（vimentin），细胞角蛋白 8 和 18（cytokeratin8 和 18），表达低水平的 CD10 和 FLK1（KDR）［Kögler et al.，2004］。

USSCs 能体外传代 20 次以上，相当于群体倍增 40 次以上，而无任何自发的分化。USSCs 表达不同的细胞因子受体，转录因子和表面分子的转录子，包括 EGF 受体，

PDGF 受体，IGF 受体，Runt 相关转录因子（Runxl），YBI，CD49e 和 CD105。这些细胞不表达软骨形成的细胞外基质软骨黏附素（chondroadherin），骨特异性分子胶原酶 X 和骨涎蛋白（bone sialoprotein），肝和胰腺特异性分子 CyplAl 和 PDX-1，神经标志分子如神经元纤维（neurofilament，NF）蛋白，突触素（synaptophysin），酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）和胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acid protein，GFAP）[Kögler et al.，2005]。

USSCs 在体内外均能分化成不同系细胞，包括神经细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、造血细胞、心肌细胞、浦肯野纤维和肝细胞 [Kögler et al.，2004]。

7.4.2.4　CBEs

原代培养后一周，贴壁细胞簇形成类胚体样集落。类胚体样集落的大小和数量逐渐增多。这些贴壁细胞集落可以在第 6 或第 7 周传代，接种到二代液体培养体系中。二代 CBEs 形成的类胚体样结构形态上与原代的祖细胞集落接近。CBEs 继续生长 6 周，按指数增殖生长。二代的 CBEs 群体能大量扩增（168 倍），从 10^5 个细胞/ml 基线浓度生长到（$1.68\times10^7\pm8.84\times10^5$）个细胞 [McGuckin et al.，2005]。

CBEs 不表达造血系特异性分子，如 CD45，glycophorinA，CD38，CD7，CD33，CD56，CD16，CD3 和 CD2。这些细胞表达 CD34，CD133 和 CD164。CBEs 集落表达阶段特异性胚胎抗原 SSEA-3 和 SSEA-4。这些细胞不表达 SSEA-1。细胞集落表达胚胎细胞外基质组分（TRA 1-60 和 TRA 1-81）和胚胎干细胞转录因子 Oct-4 [Forraz et al.，2004；McGuckin et al.，2004]。CBEs 还能够分化成神经细胞和肝细胞。研究者报道一种改良的商品化的多谱系祖细胞（multi-lineage progenitor cell™，MLPCs™，来自 BioE），能够分化为多谱系细胞，包括骨、脂肪、骨骼肌、血管、肝和胰腺细胞。

7.4.2.5　CB-MPCs

CB-MPCs 是具有增殖能力、成纤维细胞样形态的细胞。在稳定传代阶段，这些细胞不表达 CD49a，CD62E，CD73，CD90 和 CD104，高水平表达 CD 14，CD31，CD44，CD45 和 CD54，变换地表达 CD104，CD105 和 CD166。这些细胞增殖能力很强，在 12 周内细胞数量能增加 28 倍。细胞周期分析显示≤82%的细胞处于 G_0/G_1 期，大约 18% 参与细胞增殖。

CB-MPCs 能够分化为组织特异的细胞类型，包括成骨、内皮、肝和神经细胞，分别代表中胚层、内胚层和外胚层，经过 RT-PCR、免疫组化、Western blot 和体外功能检测得到证实（结果未发表）。

7.4.3　总结

我们已经讨论了几种脐带或脐血来源干细胞的生物学特征。这些细胞具有高增殖潜能，多系分化成间充质谱系和（或）其他系的潜能，以及已知的干细胞特异性细胞表面抗原。这些细胞的生物学特征总结在表 7.1。

表 7.1　脐带和脐血来源干细胞的生物学特征

增殖潜能	系特异性分子	分化潜能	参考文献	
CB-MPCs	＞28 倍，12 周内	表达：CD14，CD31，CD44，CD45 和 CD54 不表达：CD49a，CD62E，CD73，CD90 和 CD104	成骨，内皮，肝脏和神经细胞	未发表
CBEs	168 倍，第二代	表达：CD34，CD133，CD164，SSEA-3，SSEA-4，Tra1-60 和 Tra 1-81，和 Oct-4 不表达：CD2，CD3　，CD7，CD16，CD33，CD38，CD45，CD56，SSEA-1 和 glycophorin A	骨，脂肪，骨骼肌，血管，肝脏，胰腺和神经细胞	Forraz et al.，2004；McGuckin et al.，2004，2005
USSCs	倍增群体数＞40	表达：CD13，CD29，CD44，CD49e，CD90，CD105，vimentin，CK8，CK18，低水平表达 CD10 和 FLK1（KDR）不表达：CD14，CD33，CD34，CD45，CD49b，CD49c，CD49d，CD49f，CD50，CD62E，CD62L，CD62P，CD106，CD117，glycophorin A 和 HLA-DR	成骨细胞，软骨细胞，脂肪细胞，造血细胞，心肌细胞，浦肯野纤维，肝脏和神经细胞	Kögler et al.，2004，2005
CB-MSCs	＞10 代	表达：CD13，CD29，CD44，CD49e，CD54，CD73，CD90，CD105，CD166 和 HLA-ABC 不表达：CD14，CD31，CD34，CD45，CD49d，CD80，CD86，CD106 和 HLA-DR	成骨细胞，软骨细胞，脂肪细胞，成肌和神经细胞	Erics et al.，2000；Goodwin et al.，2001；Hou et al.，2003；Lee et al.，2004a；Gang et al.，2004
脐静脉 MSCs	＞20 代	表达：CD13，CD29，CD44，CD49e，CD54，CD73，CD90，CD105，CD166 和 HLA-ABC 不表达：CD14，CD31，CD34，CD45，CD49d，CD51/61，CD106，CD133，cadherin-5，glycophorin A，HLA-DR 和 KDR		
UC-WJ MSCs	倍增群体数＞80	表达：CD10，CD13，CD29，CD44，CD51，CD73，CD90 和 CD105 不表达：CD14，CD31，CD33，CD34，CD38，CD40，CD40L，CD45，CD56，CD80，CD86，CD117 和 HLA-DR	成骨细胞，脂肪细胞，软骨细胞，心肌细胞和神经细胞	Mitchell et al.，2003；Wang et al.，2004；Sarugaser et al.，2005；Fu et al.，2005；Weiss et al.，2005

7.5 材料来源

目　　录	供　应　商
抗生素：青/链霉素，庆大霉素，二性霉素 B	Invitrogen
抗体：小鼠单克隆抗人 CD45，CD33，CD7 抗体；抗 glycophorin A 抗体	Autogen Bioclear Dako
枸橼酸葡萄糖 A 方（ACD-A）	Baxter
聚烯吡酮碘（Betadine）	Mundipharma Purdue
血收集袋和注射器	Green Cross MS Baxter
牛血清白蛋白（Bovine serum albumin BSA）	Sigma
细胞计数板（血细胞计数板）	Marienfeld GmbH，Germany
细胞计数液：台盼蓝	GIBCO（Invitrogen）
离心管	Falcon（BD Biosciences）
胶原酶 A（from Clostridium histolvticnm）	Roche
柱子：MS+/RS+，LS+/VS+	Miltenyi Biotec
冻存管	Nalge Nunc
细胞因子：Flt-3 配体，干细胞因子 促血小板生成素，IL-6	R & D Systems
细胞质基质（Cytomatrix）	Cytomatrix
地塞米松	Sigma，D4902
DMSO	Sigma，D2650
DMEM	Invitrogen
磁珠标记的人 IgG4，单克隆抗总小鼠 IgG	Invitrogen
磁分离仪	Invitrogen
Eagle's basal medium（EBM）	Invitrogen
FBS	Invitrogen
FcR blocking agent	Miltenyi Biotec
Fibronectin	Boehringer Mannheim（Roche Diagnostics）
Ficoll-Hypaque	Sigma，H8889
培养瓶和培养板	Nalge Nunc
粒-巨噬细胞集落刺激因子 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）	R & D Systems
胰岛素	Sigma，12767
Iscove's modified Dulbecco's medium（IMDM）	Invitrogen
谷氨酰胺（L-Glutamine）	Invitrogen
磁性细胞分离仪（Magnetic cells separator）	Miltenyi Biotec
β-巯基乙醇	Invitrogen
磁珠标记 CD34	Miltenyi Biotec
尼龙膜	BD Biosciences
PBS（PBSA）	Hyclone
青霉素，10^4 U/ml，链霉素，10 mg/ml 混合物	Invitrogen
TPOFLK 细胞因子混合物	R & D Systems
胰蛋白酶/EDTA	Invitrogen
Ultraglutamine	Cambrex

致谢

非常感谢我在 LifeCord 生物医药研究所的同事 Young-Woo Eom，Mal Sook Yang，Sun Kyung Kim，In Keun Jang，Yonag Joon Moon 和 Jong Eun Lee 的竭力支持。我们上述实验研究的成功离不开他们的努力。此外，还要感谢 Jessica Mu，Dr. Jan ho Jang 和 Dr. Swan Choi 对本文的审阅。

（韩　钦　译）

参考文献

Astori, G., Adami, V., Mambrini, G., Bigi, L., Cilli, M., Facchini, A., Falasca, E., Malangone, W., Panzani, I., Degrassi, A. (2005). Evaluation of ex vivo expansion and engraftment in NOD-SCID mice of umbilical cord blood CD34+ cells using the DIDECO "Pluricell System". *Bone Marrow Transplant.* **35**:1101–1106.

Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* **22**:625–634.

Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**:2396–2402.

Covas, D.T., Siufi, J.L., Silva, A.R., Orellana, M.D. (2003). Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**:1179–1183.

Da Silva, C.L., Goncalves, R., Crapnell, K.B., Cabral, J.M., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G. (2005). A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp. Hematol.* **33**:828–835.

De Wynter, E.A., Emmerson, A.J., Testa, N.G. (1999). Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **12**:1–17.

Deans, R.J., Moseley, A.B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical use. *Exp. Hematol.* **28**:875–884.

Dexter TM, Moore MA, Sheridan AP. (1977). Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. *J. Exp. Med.* **145**:1612–1616.

Ehring, B., Biber, K., Upton, T.M., Plosky, D., Pykett, M., Rosenzweig, M. (2003). Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix. *Cytotherapy* **5**:490–498.

Erices, A., Conget, P., Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* **109**:235–242.

Flores-Guzman, P., Gutierrez-Rodriguez, M., Mayani, H. (2002). In vitro proliferation, expansion, and differentiation of CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Arch. Med. Res.* **33**:107–114.

Forraz, N., Pettengell, R., McGuckin, C.P. (2004). Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for ex vivo expansion and enriched for LTC-IC. *Stem Cells* **22**:100–108.

Fu, Y.S., Cheng, Y.C., Lin, M.Y., Cheng, H., Chu, P.M., Chou, S.C., Shih, Y.H., Ko, M.H., Sung,

M.S. (2006). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: Potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* **24**:115–124.

Galanakis, D., Dracker, R., Fricke, W., Gomensoro-Garcia, A.E., Rosales, L., Skerrett, D., Novello, A.C., Linden, J.V. (2003). Guidelines for Collection, Processing and Storage of Cord Blood Stem Cells. 2nd Edition. New York State Department of Health.

Gang, E.J., Jeong, J.A., Hong, S.H., Hwang, S.H., Kim, S.W., Yang, I.H., Ahn, C., Han, H., Kim, H. (2004). Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* **22**:617–624.

Gerrard, L., Zhao, D., Clark, A.J., Cui, W. (2005). Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells* **23**:124–133.

Goff, J. P., Shields, D. S., Greenberger, J. S. (1998). Influence of cytokines on the growth kinetics and immunophenotype of daughter cells resulting from the first division of single CD34+Thy-1+lin-cells. *Blood* **92**:4098–4107.

Goodwin, H.S., Bicknese, A.R., Chien, S.N., Bogucki, B.D., Quinn, C.O., Wall, D.A. (2001). Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **7**:581–588.

Heike, T., Nakahata, T. (2002). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**:313–321.

Hou, L., Cao, H., Wang, D., Wei, G., Bai, C., Zhang, Y., Pei, X. (2003). Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like *cells in vitro. Int. J. Hematol.* **78**:256–261.

Jang, Y. K., Jung, D. H., Jung, M. H., Kim, D. H., Yoo, K. H., Sung, K. W., Koo, H. H., Oh, W., Yang, Y. S., Yang, S. (2006). Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann. Hematol.* **4**:1–14.

Javazon, E.H., Beggs, K.J., Flake, A.W. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* **32**:411–425.

Kadivar, M., Khatami, S., Mortazavi, Y., Shokrgozar, M.A., Taghikhani, M., Soleimani, M. (2006). In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**:639–647.

Kögler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti, E.J., Almeida-Porada, G., Muller, H.W., Zanjani, E., Wernet, P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J. Exp. Med.* **200**:123–135.

Kögler, G., Radke, T.F., Lefort, A., Sensken, S., Fischer, J., Sorg, R.V., Wernet, P. (2005). Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp. Hematol.* **33**:573–583.

Lee, M.W., Choi, J., Yang, M.S., Moon, Y.J., Park, J.S., Kim, H.C., Kim, Y.J. (2004a). Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem. Biophys. Re.s Commun.* **320**:268–273.

Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L., Chen, T.H. (2004b). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**:1669–1675.

Leung, A.Y., Verfaillie, C.M. (2005). All-*trans* retinoic acid (ATRA) enhances maintenance of primitive human hematopoietic progenitors and skews them towards myeloid differentiation in a stroma non-contact culture system. *Exp. Hematol.* **33**:422–427.

Martin-Rendon, E., Watt, S.M. (2003a). Exploitation of stem cell plasticity. *Transfus. Med.*

13:325–348.

Martin-Rendon, E., Watt, S.M. (2003b). Stem cell plasticity. *Br. J. Haematol.* **122**:877–891.

Martin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., Andrew, P.W. (2004). Specific knockdown of Oct4 and β_2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* **22**:659–668.

Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O. I., Dick, J. E. (2003). Characterization of cord blood hematopoietic stem cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **996**:67–71.

McElreavey, K.D., Irvine, A.I., Ennis, K.T., McLean, W.H. (1991). Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* **19**:29(S).

McGuckin, C.P., Forraz, N., Allouard, Q., Pettengell, R. (2004). Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp. Cell Res.* **295**:350–358.

McGuckin, C.P., Forraz, N., Baradez, M.O., Navran, S., Zhao, J., Urban, R., Tilton, R., Denner, L. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* **38**:245–255.

McNiece, I.K., Almeida-Porada, G., Shpall, E.J., Zanjani, E. (2002). Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp. Hematol.* **30**:612–616.

Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzaro, D., Testa, U., Marinucci, M., Peschle, C. (1986). Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition. *J. Clin. Invest.* **78**:51–60.

Minguell, J.J., Conget, P., Erices, A. (2000). Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**:881–887.

Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., Troyer, D., Medicetty, S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* **21**:50–60.

Moon, Y.J., Lee, M.W., Yang, M.S., Kim, S.K., Park, J.S., Kim, H.C., Kim, H.S., Lee, K.H., Kim, Y.J., Choi, J.E. (2005). Expression profile of genes representing varied spectra of cell lineages in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Acta Haematol.* **114**:117–120.

Naughton, B.A., San Roman, J., Liu, K., et al. (1997). Cells isolated from Wharton's jelly of the human umbilical cord develop a cartilage phenotype when treated with TGF-β in vitro. *FASEB J.* **11**:A18.

Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Dane, A., Gammaitoni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollet, O., Lapidot, T., Aglietta, M. (1999). Engraftment in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice of human $CD34^+$ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* **93**:3736–3748.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143–147.

Purchio, A.F., Naughton, B.A., Roman, J.S. (1999). Production of cartilage tissue using cells isolated from Wharton's jelly. U.S. Patent No. 5,919,702.

Robinson, J.N., Abuhamad, A.Z. (2000). Abdominal wall and umbilical cord anomalies. *Clin. Perinatol.* **27**:947–978.

Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., Smirnov, V.N. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem*

Cells **21**:105–110.

Rosada, C., Justesen, J., Melsvik, D., Ebbesen, P., Kassem, M. (2003). The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif. Tissue Int.* **72**:135–142.

Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R.E., Adamson, J.W., Migllaccio, G., Migliaccio, A.R., Taylor, P.E, Stevens, C.E. (1995). Processing and cryopreservation of placental umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10119–10122.

Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M.M., Davies, J.E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* **23**:220–228.

Szilvassy, S.J., Meyerrose, T.E., Ragland, P.L., Grimes, B. (2001). Differential homing and engraftment properties of hematopoietic progenitor cells from murine bone marrow, mobilized peripheral blood, and fetal liver. *Blood* **98**:2108–2115.

Takagi, M. (2005). Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:189–196.

Tian, H., Huang, S., Gong, F., Tian, L., Chen, Z. (2005). Karyotyping, immunophenotyping, and apoptosis analyses on human hematopoietic precursor cells derived from umbilical cord blood following long-term ex vivo expansion. *Cancer Genet. Cytogenet.* **157**:33–36.

Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., Ito, M., Yasukawa, K., Nakahata, T. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J. Clin. Invest.* **105**:1013–1021.

Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., Lansdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9857–9860.

Wang, H.S., Hung, S.C., Peng, S.T., Huang, C.C., Wei, H.M., Guo, Y.J., Fu, Y.S., Lai, M.C., Chen, C.C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**:1330–1337.

Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R., Rachakatla, R.S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M.S., Velagaleti, G., Troyer, D. (2005). Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* **24**:781–792.

Wharton, T.W. *Adenographia*, Translated by S. Freer. (1996). Oxford, U.K.: Oxford University Press. pp. 242–248.

Yang, S.E., Ha, C.W., Jung, M., Jin, H.J., Lee, M., Song, H., Choi, S., Oh, W., Yang, Y.S. (2004). Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy* **6**:476–486.

Yildirim, S., Boehmler, A.M., Kanz, L., Mohle, R. (2005). Expansion of cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. *Bone Marrow Transplant.* **36**:71–78.

Zanjani, E.D., Ascensao, J.L., Tavassoli, M. (1993). Liver derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* **81**:399–404.

Zhang, Y., Li, C., Jiang, X., Zhang, S., Wu, Y., Liu, B., Tang, P., Mao, N. (2004). Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp. Hematol.* **32**:657–664.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**:211–228.

第8章　牙髓多能干细胞

WATARU SONOYAMA,[1,2] TAKAYOSHI YAMAZA,[1] STAN GRONTHOS,[3] and SONG-TAO SHI[1]

[1]Center for Craniofacial Molecular Biology，School of Dentistry，University of Southern California，2250 Alcazar Street，CSA 103，Los Angeles，CA 90033，USA；[2]Department of Oral and Maxillofacial Rehabilitation，Okayama University Graduate School of Medicine，Dentistry and Pharmaceutical Sciences，2-5-1 Shikata-cho，Okayama，700-8525，Japan；[3]Mesenchymal Stem Cell Group，Division of Haematology，Institute of Medical and Veterinary Science，Frome Road，Adelaide 5000，South Australia，Australia

Corresponding author：songtaos@usc. edu

8.1 背景介绍

人牙冠是由牙釉质、牙本质和牙髓质组成。在牙齿生长和发育过程中，成釉细胞生成牙釉质，成牙本质细胞生成初期牙本质。出牙后，成釉细胞从牙釉质表面消失；而后牙釉质在体内的形成就自然停止了。与此相反，成牙本质细胞沿着牙髓腔内的牙本质内表面分布，在整个生命过程中会持续的沉积牙本质基质形成次生性牙本质［Baume，1980；Smith et al.，1995］。除了次生性牙本质，成牙本质细胞在多种刺激下还能形成第三次牙本质，如机械的、化学的和（或）细菌刺激［Cox et al.，1992；Kitamura et al.，1999；Smith et al.，1990，1994］。即使成牙本质细胞受到破坏，牙髓还能形成修复性牙本质保护牙髓，免于进一步的破坏。这种修复性牙本质形成认为可能是牙髓组织中新生成的成牙本质细胞介导的［Ruch，1998；Sveen and Hawes，1968］。这些发现提示牙髓组织中可能存在成牙本质祖细胞或干细胞［Butler et al.，1997；Ruch，1998；Sveen et al.，1968］。已经有研究报告证实了牙髓组织中存在具有增殖潜能的成牙本质细胞样细胞，这些细胞能够在体外形成矿化结节［Buurma et al.，1999；Couble et al.，2000；Kuo et al.，1992；Shiba et al.，1995；Tsukamoto et al.，1992］。但在这些研究中，从牙髓分离得到的细胞向成牙本质细胞样细胞分化的能力有限，且不能分化为其他类型细胞，如脂肪细胞或神经元。最近，Tecles 及其同事证实了具有增殖潜能的成牙本质前体细胞从血管迁移到损伤的牙髓或牙本质组织［Tecles et al.，2005］。综上所述，这些研究结果都报道了牙髓组织中存在成牙本质前体细胞（preodontoblast cell），令人相信设想中的牙干细胞群体是存在的。

间充质干细胞（bone marrow Mesenchymal stem cells，BM-MSCs）最早是从骨髓中分离到的，是一个出生后多能干细胞群体［Gronthos et al.，1994，1996，2003；Owen et al.，1988；Pittenger et al.，1999；Prockop，1997；Simmons et al.，1991；Sonoyama et al.，2005］。BM-MSCs 的一个重要特征是体外能够形成单细胞来源的集落，即成纤维细胞集落形成单位（colony forming unit-fibroblast，CFU-F）［Friedenstein，1976；Friedenstein et al.，1970］。对 BM-MSCs 的细胞表型特征的深入认识使得我们从人的第三磨牙的牙髓（dental pulp stem cells；DPSCs）和乳牙（stem cells from human exfoliated deciduous teeth；SHED）中分离到预想的干细胞群体，这些干细胞群体与 BM-MSCs 有类似的特征。牙髓中的干细胞存在于特殊的血管微环境，在那里它们处于静息状态，维持其基本的干细胞特征，包括自我更新能力和未分化的状态［Shi and Gronthos，2003］。这种特殊的微环境称为“干细胞龛位”（stem cell niche）［Bianco and Robey，2001；Doherty et al.，1998；Fuchs et al.，2004；Moore and Lemischka，2006］。因此，分离任何 MSCs 时，都要考虑它们的龛位微环境，从而找到维持它们体外培养时“干性”（stemness）的细胞因子，避免在体外扩增过程中逐渐丢失了干细胞样的特征。本章节中，我们提供了 DPSC 和 SHED 分离、纯化制备、扩增和组织再生潜能的详细实验方案。

8.2 培养基与试剂的制备

8.2.1 培养基

所有培养基必须经过 0.22μm 过滤膜过滤除菌，4℃保存。

8.2.1.1 间充质干细胞培养基（MSCs 培养基）

制备含 2 mmol/L 谷氨酰胺的 α-MEM，添加 15%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），0.1 mmol/L 左旋抗坏血酸磷酸盐（L-ascorbic acid phosphate），100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素（表 8.1）。选择合适批号的 FBS 对成功培养 MSC 是关键。我们根据集落形成效率来挑选 FBS。简单来说，原代 MSCs 按相同的密度接种在几种 FBS 配制的培养基中，然后计数集落的形成。通常形成集落数多的 FBS，MSCs 的增殖也会更好。

表 8.1　MSC 培养基的制备

试剂	储存浓度	所需试剂的体积	终浓度
α-MEM	1×	410	1×
FBS	—	75	15%
谷氨酰胺	200mmol/L	5	2 mmol/L
左旋抗坏血酸磷酸盐	10 mmol/L	5	0.1 mmol/L
青/链霉素	10 000U/ml	5	100 U/ml
终体积		500	

8.2.1.2 成牙分化培养基

在 MSC 培养基中加入 0.01μmol/L 地塞米松磷酸钠，1.8 mmol/L 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）（表 8.2A）。

8.2.1.3 成脂分化培养基

在 MSC 培养基中加入 0.5μmol/L IBMX（异丁基甲基黄嘌呤，isobutylmethylxanthine），60μmol/L 吲哚美辛，0.5μmol/L 氢化可的松和 10μg/ml 胰岛素（表 8.2B）。

8.2.1.4 神经分化培养基

制备 Neurobasal A 加 B27 supplement，20 ng/ml 表皮生长因子（EGF），40 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF），100 U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素（表 8.2C）。

表 8.2　分化培养基的配制

试剂	储存浓度	所需试剂的体积（ml）	终浓度
		A 成牙分化培养基的制备	
α-MEM	1×	404.5	1×
FBS	—	75	15%
谷氨酰胺	200 mmol/L	5	2 mmol/L
左旋抗坏血酸磷酸盐	10 mmol/L	5	0.1 mmol/L
青/链霉素	10 000 U/ml	5	100 U/ml
地塞米松	10μmol/L	0.5	0.01 μmol/L
KH_2PO_4	180 mmol/L	5	1.8 mmol/L
终体积		500	
		B 成脂分化培养基的制备	
α-MEM	1×	398.25	1×
FBS	—	75	15%
谷氨酰胺	200 mmol/L	5	2 mmol/L
左旋抗坏血酸磷酸盐	10 mmol/L	5	0.1 mmol/L
青/链霉素	10 000 U/ml	5	100 U/ml
IBMX	50 mmol/L	5	0.5 mmol/L
氢化可的松	0.5 mmol/L	0.5	0.5 μmol/L
吲哚美辛	6 mmol/L	5	60 μmol/L
胰岛素	4mg/ml	1.25	10μg/ml
终体积		500	
		C 神经分化培养基的制备	
Neurobasal A	1×	484.45	1×
B27 supplement	50×	10	1×
EGF	200μg/ml	0.05	20ng/ml
bFGF	40μg/ml	0.5	40ng/ml
青/链霉素	10 000 U/ml	5	100 U/ml
终体积		500	

8.2.2　组织消化液

8.2.2.1　胶原酶溶液

将 4mg/ml 胶原酶（I 型）溶解在不含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲液（PBSA）中，过滤除菌，储存在－20℃。

8.2.2.2　中性蛋白酶溶液

将 2mg/ml 中性蛋白酶溶解在 PBSA 中，过滤除菌，储存在－20℃。

8.2.3　冻存液

8.2.3.1　冻存液 I

FBS，100%，储存在 4℃。

8.2.3.2 冻存液 II

80%的 FBS 和 20%的二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO），过滤除菌，储存在 4℃。

8.3 培养的具体方案

8.3.1 安全措施

供者的健康情况并不都是十分清楚的。因此，在处理组织和可能污染的器材和材料时，要非常小心，避免疾病传播。

8.3.2 组织处理

牙齿拔掉后立即浸泡在无菌生理盐水溶液或 PBSA 中。建议在这些溶液中加入双倍的抗生素（如青霉素和链霉素）。如果乳牙意外掉下，也可以保存在上述的无菌溶液中。如果牙齿在合适的条件下保存，细胞的分离最长可以 24h 后进行。当然最好是尽可能早地从牙齿中分离细胞。

8.3.3 牙髓组织的分离

牙髓组织应放置在低温潮湿的条件下，尤其在牙齿切除的过程中，这一点对保持细胞活力非常重要。

牙齿可能被污染，因为它一直暴露在有大量细菌的口腔内。尽管牙髓组织被牙齿坚固的组织包围（牙釉质、牙本质和牙骨质），没有暴露在口腔内。但 SHED 分离时，乳牙的牙髓有时还是会通过牙根吸入而暴露。因此，为了成功分离细胞，在分离牙髓前，将牙外表面用消毒剂进行消毒灭菌是非常重要的。

方案 8.1 牙髓组织的分离

试剂与材料

灭菌

- □ 无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS（PBSA）
- □ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）
- □ 培养皿
- □ 精细镊（小号和大号）
- □ 牙科碳化钻头
- □ 牙挖器
- □ 高速牙科手机

非灭菌

☐ 使用高速牙科手机时的装备（如空气压缩机）

☐ 消毒液（如聚维酮碘）

步骤

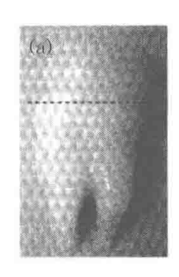
(a) 用 PBSA 洗三遍，充分清洁牙齿表面。

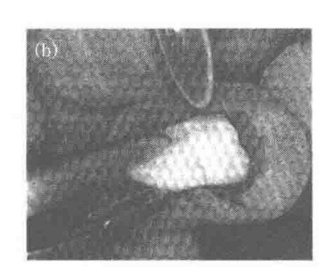
(b) 用消毒液消毒，然后再用 PBSA 充分清洗。

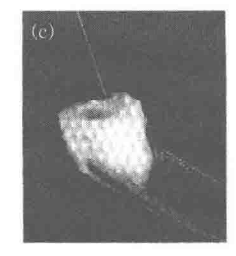
(c) 用连接牙科手机的牙科碳化砖头，沿骨质和釉质的结合处切开牙齿，然后暴露髓腔（图 8.1a，b；彩图 12A，B）。间歇地将牙齿在用冰预冷的 PBSA 中浸泡，避免切割过程中过热。在 SHED 分离时，有时由于牙根吸收牙髓已经暴露了，就不需要进行这个步骤。

(d) 用小号精细镊或牙挖器，轻轻从牙髓腔中分离牙髓组织（图 8.1 c，d；彩图 12C，D）。

(e) 将牙髓组织放入培养皿中的少量 MSC 培养液中。注意不要使组织变干。







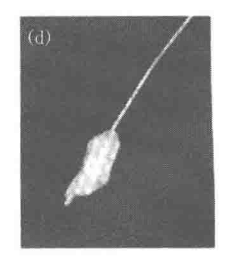


图 8.1　从拔除的第三臼齿中分离牙髓组织

(a) 肉眼观察拔除的牙齿。虚线指示牙骨质-釉质的连接处。(b—d) 牙齿沿牙骨质-釉质连接处切开，然后分离牙髓组织。所有这些步骤都要无菌操作（见彩图 12）。

8.3.4　DPSCs/SHED 的原代培养

本分离方案是基于干细胞具有贴壁生长和形成独立的克隆样集落的能力 [Friedenstein，1976；Friedenstein et al.，1970]。为了获得单细胞来源的集落，非常重要的一点是将牙髓组织中的 DPSCs 和 SHED 从它们的围血管龛位中释放出来 [Shi and Gronthos，2003]。用无菌的手术刀片将牙髓切成小片段。然后需要用酶消化，最终获得牙髓组织中预想的干细胞。不过，酶消化时间如果超过 1h，可能会损伤干细胞。每个研究者需要摸索消化的最佳条件。通常要充分消化切碎的牙髓组织，需要 30～60min。

细胞分离后，建议 1 天后就更换培养基，把污染概率降到最低。如果污染可能性较高时，在分离后 5h 就更换培养基。

从牙髓中分离的细胞通常按[(1～10)×10^3 个细胞/cm^2] 密度接种。为了检测集落形成率（CFU-F assay），建议低细胞密度 [(0.1～1.0)×10^3 个细胞/cm^2] 接种，使得单个细胞集落能互相分开来。

要纯化牙髓干细胞，可以在培养前进行免疫筛选 [Shi and Gronthos，2003] [见方

案 8.2，步骤（g）]。将酶消化后的牙髓组织通过 70μm 的细胞滤网过滤，获得单细胞悬液。然后将这些细胞和能与 DPSC 细胞反应的一抗孵育，包括 STRO-1（小鼠抗人 MSC；IgM），CC9（小鼠抗人 CD 146/MUC-18；IgG2a）或 3G5（小鼠抗人外膜细胞；IgM）[Shi and Gronthos，2003]。孵育结束后，用含 1%牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）的 PBSA 洗，接着与磁珠结合的羊抗小鼠 IgG 或大鼠抗小鼠 IgM 任意一个二抗孵育。结合有磁珠的细胞通过 Dynal MPC®-1 磁分离器分离。STRO-1-，CD146-，或 3G5-阳性细胞按 [$(1\sim10)\times10^3$ 个细胞/cm^2] 细胞密度接种到生长培养基中，按下述步骤进行 [见方案 8.2，步骤（h）]。

方案 8.2　DPSCs/SHED 的原代培养

试剂与材料

灭菌

☐ PBSA

☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）

☐ 胶原酶（见 8.2.1.1 节）

☐ 中性蛋白酶（见 8.2.1.2 节）

☐ 免疫磁珠分选时所需试剂：

(i) 含 1% BSA 的 PBSA

(ii) 与 DPSC 反应的一抗，用 STRO-1（小鼠抗人 MSC；IgM），CC9（小鼠抗人 CD146/MUC-18；IgG2a），或 3G5（小鼠抗人外膜细胞；IgM）

(iii) 羊抗小鼠 IgG-结合或大鼠抗小鼠 IgM-结合磁珠

☐ 培养瓶和培养皿

☐ 手术刀片和刀柄

☐ 70μm 细胞滤网

非灭菌器材，用于免疫磁珠分选

☐ 回转式混合仪

☐ Dynal MPC®-1 磁分离器

步骤

(a) 用手术刀片将牙髓组织切成小碎片。

(b) 将剪碎的组织放入胶原酶/中性蛋白酶混合溶液中（1∶1）。

(c) 37℃孵育 30～60min，间歇地摇匀组织/消化酶混合物。

(d) 消化后，加入足够的 MSC 培养基，终止酶的活性。

(e) 将悬液经 70μm 细胞滤膜过滤，去除细胞碎片，得到单细胞悬液。

(f) 500*g* 离心 6min。

(g) 倒掉上清液，用 MSC 培养基重悬细胞。然后进行免疫磁珠分选：

i）和能与 DPSC 细胞反应的一抗孵育，包括 STRO-1（小鼠抗人 MSC；IgM），CC9（小鼠抗人 CD 146/MUC-18；IgG2a），或 3G5（小鼠抗人外膜细胞；IgM），20μg/ml，冰上孵育 1h。

ii）用含 1%BSA 的 PBSA 洗两遍，600*g* 离心 6min。

iii）羊抗小鼠 IgG 或大鼠抗小鼠 IgM 结合磁珠的任意一个二抗孵育，4℃回转式混合仪 40min。

iv）根据产品说明书推荐的方案，通过 Dynal MPC®-1 磁分离器分离结合磁珠的细胞。

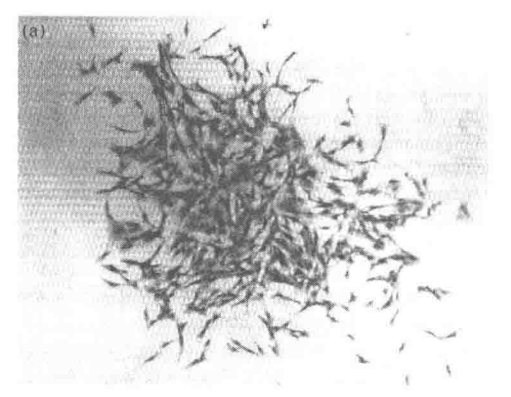
(h) 细胞计数，按 $(1\sim10)\times10^3$ 个细胞/cm^2 密度接种到培养瓶或皿上。

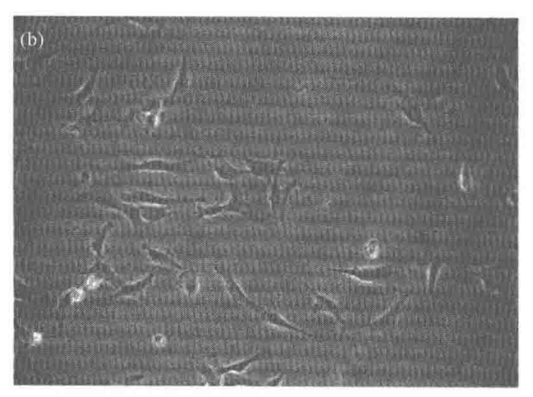
(i) 在 MSC 培养基、37℃和 5% CO_2 的培养箱中培养。

(j) 细胞分离后 7 天，用 PBSA 洗培养瓶，更换培养基。之后可以一周两次更换培养基，直至细胞达到汇合。

8.3.5 传代培养

通常细胞分离后 1 周，培养瓶中可以观察到明显的集落形成，细胞呈典型的成纤维





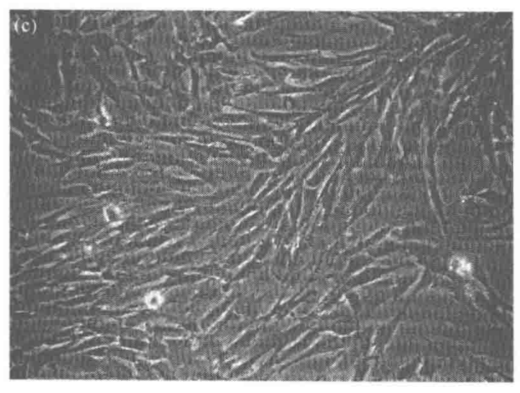


图 8.2 DPSCs 的形态

(a) 原代 DPSCs 克隆形成的代表图片（原放大倍数，×50）；(b) 低密度的传代细胞（原放大倍数，×200）；(c) 高密度的传代细胞（原放大倍数，×200）。

细胞样纺锤形（图 8.2）。在细胞 100%汇合前（通常大约 2～3 周以后），细胞需要传代，按下述步骤进行。

每个集落理论上来源于一个 CFU-F [Friedenstein，1976，1980；Friedenstein et al.，1970]，可以用克隆环分离。此外，单个集落也可以在传代后通过系列稀释去获得，或者用 STRO-1 和 CD146 抗体进行流式分选（FACS）得到。

如果以没有分选的细胞进行培养，偶尔也可观察到类似上皮细胞或内皮细胞样形态的细胞集落 [Huang et al.，2006]。通常这些污染的细胞会在细胞传代过程中消失。如果污染的细胞增多，在传代过程中进行以下三个步骤：首先，胰蛋白酶消化时间缩短，仅基质细胞脱落，由于上皮或内皮细胞样细胞贴壁更牢固；其次，传代培养后 4～6h 更换培养基，由于基质细胞较污染的细胞贴壁时间更早；最后，也是最可靠的方法就是用 FACS 将 DPSCs 与上皮细胞分离，根据上述的方法用 STRO-1 或 CD146 抗体用于 DPSCs 的分选 [Shi and Gronthos，2003]。

方案 8.3 DPSCs 的传代培养

试剂与材料

灭菌

- ☐ PBSA
- ☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）
- ☐ 胰蛋白酶-EDTA 溶液：0.05%胰蛋白酶，0.54mmol/L（0.2%）EDTA，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's 平衡盐溶液溶解

步骤

(a) 用 PBSA 洗培养瓶/皿三次。

(b) 加足够的胰蛋白酶-EDTA 溶液，37℃孵育。

(c) 在 80%的贴壁细胞从培养表面脱离时，加入 MSC 培养基。

(d) 500 *g* 离心 6min。

(e) 倒掉上清，用 MSC 培养基重悬细胞。

(f) 细胞计数，按需要的细胞密度接种。

(g) 在 MSC 培养基，37℃和 5% CO_2 的培养箱中培养。

8.3.6 冻存与复苏

牙髓干细胞可以按通常的方案进行冻存和复苏（见第 2 章和方案 8.4）。在方案中以下几点非常重要：

(1) 在接近对数生长期结束（大约 80%～90%汇合）时收集的细胞最适于冻存。

(2) 细胞数目最好在 (1～2)×10^6 细胞/管左右，含 1.5ml 冻存液。细胞密度太低或太高可能降低复苏效率。

(3) 冻存保护液（DMSO）应在低温（如冰上）逐渐加到 10% 。

(4) 用高血清浓度（终浓度 90% FBS 和 10% DMSO）辅助细胞存活。

方案 8.4　DPSCs 的冻存

试剂与材料

灭菌

- ☐ PBSA
- ☐ 用冰预冷的冻存液 I（见 8.2.3.1 节）
- ☐ 用冰预冷的冻存液 II（见 8.2.3.2 节）
- ☐ 胰蛋白酶-EDTA 溶液：0.05%胰蛋白酶，0.54mmol/L（0.2%）EDTA，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's 平衡盐溶液溶解
- ☐ 1.8ml 冻存管

步骤

(a) 用 PBSA 洗培养瓶/皿三次。

(b) 加足够的胰蛋白酶-EDTA 溶液，37℃孵育。

(c) 在 80%的贴壁细胞从培养表面脱离时，加入 MSC 培养基。

(d) 500 *g* 离心 6min。

(e) 倒掉上清，用冰上预冷的冻存液 I 重悬细胞。

(f) 细胞计数，然后稀释或浓缩细胞到终浓度的 2 倍。继续将装有细胞的试管放置在冰上。

(g) 在冰上边转动试管边缓慢加入等体积的冻存液 II。

(h) 等量按份加入冻存管。

(i) 将冻存管放入程控降温仪。慢速冷冻盒和－80℃冰箱也可用于降低冷却速度。将冻存管放入液氮长期储存。

方案 8.5　DPSCs 冻存后复苏

试剂与材料

灭菌或无菌

- ☐ 冻存管，直接从液氮罐中取出
- ☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）

步骤

(a) 将冻存管放入 37℃水浴，快速溶化（1～2min）对最好的复苏效果很重要。

(b) 加足够体积的 MSC 培养基，充分混匀。

(c) 500*g* 离心 6min。

(d) 倒掉上清，将细胞重悬于 MSC 培养基中。

(e) 用台盼蓝染色，进行活细胞计数，然后按需要的细胞密度接种。

(f) 在 MSC 培养基，37℃和 5% CO_2 的培养箱中培养。

8.3.7 未分化的 DPSCs 和 SHEDDE 鉴定

STRO-1 是 MSC 的早期细胞标志分子之一，可用于鉴定 DPSCs 和 SHED 的未分化状态。STRO-1 的单克隆抗体首先是作为能与人骨髓 CFU-F 细胞表面高表达的分子作用的试剂被大家所认识的 [Dennis et al.，2002；Gronthos et al.，1994，1999；Simmons et al.，1994]。骨髓来源的 STRO-1 阳性细胞中包含了 CFU-F 群体，具有分化为多系细胞的潜能，包括支持骨髓的基质细胞、成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞 [Gronthos et al.，2003；Shi and Gronthos，2003；Simmons et al.，1991]。DPSC 和 SHED 中含有大约 10%～20% 的 STRO-1 阳性细胞 [Gronthos et al.，2000；Miura et al.，2003]。CD146 (MUC18) 已知是 BM-MSCs 可能的标志分子 [Filshie et al.，1998]，DPSCs 和 SHED 也表达 [Gronthos et al.，2000，2003；Miura et al.，2003；Shi and Gronthos，2003]。这些标志分子能用于免疫组化或 FACS 检测。

牙本质涎磷蛋白 (Dentin sialophosphoprotein，DSPP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase，AP)、骨涎蛋白 (bone sialoprotein，BSP) 和骨钙蛋白 (osteocalcin，OSC) 是成牙本质细胞和成骨细胞的代表性系特异性分子 [Feng et al.，1998；MacDougall et al.，1997]。核结合因子 (Core binding factor 1，Cbfal) /Runt 相关基因因子 (Runt-related gene factor 2，Runx2) 和 osterix 也是成骨细胞特异性的转录因子，因此可能在牙齿的发育过程中也发挥关键作用 [D'Souza et al.，1999；Ducy et al.，1997；Nakashima et al.，2002；Thesleff and Aberg，1999]。用 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 和 Western 杂交方法检测，未分化的 DPSCs 和 SHED 均不表达或无显著表达这些分子的基因 [Gronthos et al.，2000，2002；Miura et al.，2003]。其他细胞类型的谱系特异性分子，如脂肪细胞的 PPARγ2 (proliferator-activated receptor-γ2) 和 LPL (lipoprotein lipase)，神经细胞的 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 和 nestin。在细胞诱导分化前，用 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 和 Western blot 方法检测也不表达或无显著表达 [Gronthos et al.，2000，2002；Miura et al.，2003]。

非常值得注意的一点，体外扩增后的 DPSCs 和 SHED 是不均一的群体 [Gronthos et al.，2002；Kuznetsov et al.，1997；Owen et al.，1988；Pittenger et al.，1999]，随着连续传代会逐渐的丢失它们的干性 (STRO-1 和 3G5 的表达丢失)。例如，无任何诱导，DPSCs 就会随传代部分分化为成牙本质细胞谱系的细胞。传代 4 或 5 次后，用 RT-PCR 就能检测到 DSPP 和 OSC 的表达 (累计群体倍增数大约为 20) [未发表的资料]。因此，DPSCs 和 SHED 如果要作为干细胞使用时，使用早期传代的细胞非常重要。还需要进一步建立合适、理想的培养条件以维持 DPSCs 和 SHED 的干性。

8.4　分化潜能与鉴定

8.4.1　成牙/成骨分化

体外，在含有地塞米松、无机磷酸盐和 L-抗坏血酸的培养基中，DPSCs 和 SHED 能分化为成牙本质细胞和成骨细胞。在诱导后，这种分化可通过成牙本质细胞和成骨细胞相关的标志分子表达上调得到证实，如 DSPP，BSP，AP，cbfal 和 osterix。同时，也应该观察到 STRO-1 的表达下调。培养后几周，显微镜下可观察到钙沉积而形成的矿化结节。这种钙沉积可用茜素红染色（Alizarin Red staining）（图 8.3a；彩图 9A）检测或商品化的试剂盒定量检测。

非常重要的结果是 DPSCs 和 SHED 与羟磷灰石/磷酸三钙（hydroxyapatite/tricalcium phosphate，HA/TCP）载体一起皮下接种到免疫低下小鼠时，能生成牙本质-牙髓复合物（图 8.3b；彩图 9B）[Gronthos et al.，2000，2002；Miura et al.，2003]。生成的矿化基质沿着成牙本质细胞呈典型的管状结构，这是天然牙本质-牙髓复合物的一个特征。这个基质的来源及特征用抗人特异性的线粒体、DSPP 和 BSP 抗体，通过免疫染色的方法鉴定 [Gronthos et al.，2000；Miura et al.，2003]。从移植组织中，可以重新获得维持成牙本质能力的细胞，这提示了 DPSCs 具有自我更新的能力。非常有意思的是，SHED 能通过募集宿主细胞，被诱导形成具有层状结构的骨样基质 [Miura et al.，2003]。这种生成骨的能力，可能与乳牙的自然特征相关，乳牙的牙根吸收后，随即就发生骨和恒牙长出。SHED 移植物生成的骨样基质的另一个有意思的特征是缺乏骨髓成分。而 BM-MSC 移植物生成的骨样基质则包含了与骨髓一致的组成 [Batouli et al.，2003]。

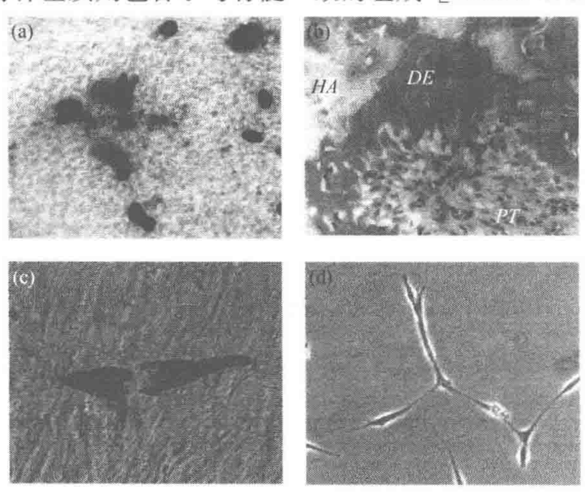


图 8.3　DPSCs 的分化潜能

(a) 在矿化条件下培养 2 周后，矿化结节形成（×100）。结节被茜素红 S（Alizarin Red）染色；(b) 移植后 8 周 DPSCs 生成的牙本质-牙髓复合物（放大倍数，×400）。管状结构的牙本质样基质（Dentin-like matrix，DE）在载体（HA）的表面伴髓样组织（PT）生成；(c) DPSCs分化为脂肪细胞。聚集成簇的脂滴被油红 O 染色（放大倍数，×400）；(d) 神经诱导 2 周后出现带有长突触的细胞（放大倍数，×400）（亦见于彩图 9）。

方案 8.6 体外 DPSCs 的成牙和成骨分化

试剂与材料

灭菌

☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）

☐ 成牙分化培养基（见 8.2.1.2 节）

步骤

(a) 用常规 MSC 培养基培养细胞，直到细胞达到完全汇合。

(b) 更换为成牙分化培养基，每周换 2～3 次培养基，持续培养 6 周。（汇合后，细胞可能容易从培养容器的表面脱离。因此，换培养基时要非常小心，避免细胞脱落。）

方案 8.7 体内 DPSCs 的成牙和成骨分化

试剂与材料

灭菌

☐ PBSA

☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）

☐ 胰蛋白酶-EDTA 溶液：0.05%胰蛋白酶，0.54mmol/L（0.2%）EDTA，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's 平衡盐溶液溶解

☐ 冻存管，1.8ml

☐ 合适的载体（羟基磷灰石/磷酸三钙载体，HA/TCP）

步骤

(a) 用 MSC 培养基培养，直到细胞到达 90%汇合。

(b) 用 PBSA 洗培养皿，洗 3 次。

(c) 加足够体积的胰蛋白酶-EDTA 溶液，37℃孵育。

(d) 确定 80%的细胞已从培养容器表面脱离，然后加 MSC 培养基。

(e) 500 *g* 离心 6 min。

(f) 倒掉上清，用 MSC 培养基重悬细胞。

(g) 细胞计数。

(h) 将重悬于 MSC 培养基的 $(2\sim4)\times10^6$ 个细胞和载体混合，置于 1.8ml 冻存管中。

(i) 37℃旋转孵育 1h。

(j) 无菌条件下，将混合物移植到免疫力低下的小鼠皮下。我们通常使用 NIH 的 bg-nu/nu-xid 小鼠进行移植。

(k) 在合适的时间点，收集移植物，组织学检测。（在 HA/TCP 载体和 bg-nu/nu-

xid 小鼠体系中，8 周的时间足够 DPSCs 和 SHED 形成充分的矿化基质。收集的时间点主要决定于体系。）

8.4.2　成脂分化

尽管在牙髓中没有脂肪细胞，DPSCs 和 SHED 能够在合适的诱导条件下分化为胞浆中大量脂滴聚集的脂肪细胞［Gronthos et al.，2000，2002；Miura et al.，2003］。这些成簇的脂滴很容易在显微镜下进行鉴定，还可以在成脂诱导后几周通过油红 O 染色检测（图 8.3c；彩图 9C）。此外，RT-PCR 检测脂肪细胞相关的基因（PPARr2 和 LPL）上调。

与预期的结果一样，DPSCs 和 SHED 的成脂分化能力低于 BM-MSCs。这可能是它们来源组织上的自然差异造成的（脂肪组织在成年人的长骨骨髓腔内出现）。

方案 8.8　体外 DPSCs 的成脂分化

试剂与材料

灭菌

☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）

☐ 成脂分化培养基（见 8.2.1.3 节）

步骤

(a) 用常规 MSC 培养基培养细胞，直到细胞达到完全汇合。

(b) 更换为成脂分化培养基，每周换 2～3 次培养基，持续培养 6 周。（分化后的脂肪细胞容易从培养容器的表面脱离。因此，换培养基时要非常小心，避免细胞脱落。）

8.4.3　神经分化

牙髓的发育与神经嵴细胞密切相关［Chai et al.，2000；Nosrat et al.，2001；Thesleff and Aberg，1992］。因此，推测 DPSCs 和 SHED 可能具有向神经细胞分化的潜能。事实上，在特殊的体外诱导条件下，DPSCs 和 SHED 能够向神经细胞分化，形成狭长的细胞突触（图 8.3d）［Gronthos et al.，2000，2002；Miura et al.，2003］。神经分化的鉴定包括形态学观察和神经特异性分子的表达检测，其中神经特异性分子包括 GFAP、巢蛋白（nestin）、神经微丝 M（neurofilament M）、神经元核蛋白（neuronal nuclear protein，NeuN）、2′，3′-环核苷酸-3′-磷酸二酯酶（2′，3′-cyclic nucleotide-3′-phosphodiesterase，CNPase）、β-III 微管蛋白（tubulin）和谷氨酸脱羧酶（glutamic acid decarboxylase，GAD）。有些细胞能够形成神经干细胞培养时出现的球样结构。经神经分化培养基培养的 SHED 移植后能够在小鼠大脑内至少存活一周并呈神经元表型［Miura et al.，2003］。

方案 8.9　体外 DPSCs 的成神经分化

试剂与材料

灭菌

- ☐ MSC 培养基（见 8.2.1.1 节）
- ☐ 神经分化培养基（见 8.2.1.4 节）
- ☐ 明胶，0.1%

步骤

(a) 培养板用明胶包被 30min 后，晾干。

(b) 将细胞以相对低密度接种，接种密度为 (0.1～1.0)×10^3 个细胞/cm^2，用神经分化培养基培养。

(c) 每天更换培养基，通常持续培养 4 周。

8.5　讨论

DPSCs 和 SHED 来源于容易获得的组织材料，具有强大的群体倍增能力，因此能够大量扩增，达到足够的供治疗需要的细胞数量。它们可能是自体干细胞移植的重要干细胞来源。尽管已经证实 DPSCs 和 SHED 在体内能够再生牙本质/牙髓和骨组织，但仍需进一步研究如何体外维持其干性和体内获得最佳的组织再生。

8.6　材料来源

目　录	货　号	供　应　商
α-MEM	22571	Invitrogen (GIBCO)
B27 supplement	17504	Invitrogen (GIBCO)
人重组的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)	354060	BD Biosciences
70μm 细胞滤网		BD Biosciences
冻存管	375418	Nunc
I 型胶原酶	CLOSA	Worthington Biochernicals Corp.
地塞米松磷酸钠	D 1159	Sigma
二甲基亚砜 (DMSO)	D 2650	Sigma
Dispase II（中性蛋白酶）		Roche
Dynabeads		Invitrogen (Dynal)
Dynal MPC®-1		Invitrogen (Dynal)
表皮生长因子 (EGF)	GF001	Millipore (Chemicon)
明胶	07903	StemCell Technologies Inc.
谷氨酰胺	P300-100	Invitrogen (Biosource)

续表

目　录	货　号	供　应　商
氢化可的松	H 0396	Sigma
吲哚美辛	I 7378	Sigma
胰岛素	28150	Invitrogen (GIBCO)
异丁基甲基黄嘌呤（isobutylmethylxanthine，IBMX）	I 7018	Sigma
L-抗坏血酸磷酸盐		Wako Chemicals.
磷酸二氢钾（KH_2PO_4）	P 5655	Sigma
Neurobasal A	10888	Invitrogen (GIBCO)
青/链霉素	15140	Invitrogen (Biosource)
胰蛋白酶/EDTA	0249	Invitrogen (GIBCO)

（韩　钦　译）

参考文献

Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T.W., Fisher, L.W., Gronthos, S., Robey, P.G., Shi, S. (2003). Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J. Dent. Res.* **82**:976–981.

Baume, L.J. (1980). The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monogr. Oral Sci.* **8**:1–220.

Bianco, P., Robey, P.G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* **414**:118–121.

Butler, W.T., Ritchie, H.H., Bronckers, A.L. (1997). Extracellular matrix proteins of dentine. *Ciba Found. Symp.* **205**:107–115; discussion 115–117.

Buurma, B., Gu, K., Rutherford, R.B. (1999). Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *Eur. J. Oral Sci.* **107**:282–289.

Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P. Jr., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* **127**:1671–1679.

Couble, M.L., Farges, J.C., Bleicher, F., Perrat-Mabillon, B., Boudeulle, M., Magloire, H. (2000). Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif. Tissue Int.* **66**:129–138.

Cox, C.F., White, K.C., Ramus, D.L., Farmer, J.B., Snuggs, H.M. (1992). Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int.* **23**:257–270.

D'Souza, R.N., Aberg, T., Gaikwad, J., Cavender, A., Owen, M., Karsenty, G., Thesleff, I. (1999). Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* **126**:2911–2920.

Dennis, J.E., Carbillet, J.P., Caplan, A.I., Charbord, P. (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* **170**:73–82.

Doherty, M.J., Ashton, B.A., Walsh, S., Beresford, J.N., Grant, M.E., Canfield, A.E. (1998). Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **13**:828–838.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**:747–754.

Feng, J.Q., Luan, X., Wallace, J., Jing, D., Ohshima, T., Kulkarni, A.B., D'Souza, R.N., Kozak, C.A., MacDougall, M. (1998). Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin

sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **273**:9457–9464.

Filshie, R.J., Zannettino, A.C., Makrynikola, V., Gronthos, S., Henniker, A.J., Bendall, L.J., Gottlieb, D.J., Simmons, P.J., Bradstock, K.F. (1998). MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia* **12**:414–421.

Friedenstein, A.J. (1976). Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* **47**:327–359.

Friedenstein, A.J. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol. Blood Transfus.* **25**:19–29.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* **3**:393–403.

Fuchs, E., Tumbar, T., Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**:769–778.

Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* **81**:531–535.

Gronthos, S., Graves, S.E., Ohta, S., Simmons, P.J. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84**:4164–4173.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13625–13630.

Gronthos, S., Simmons, P.J. (1996). The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J. Hematother.* **5**:15–23.

Gronthos, S., Zannettino, A.C., Graves, S.E., Ohta, S., Hay, S.J., Simmons, P.J. (1999). Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J. Bone Miner. Res.* **14**:47–56.

Gronthos, S., Zannettino, A.C., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortesidis, A., Simmons, P.J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* **116**:1827–1835.

Huang, G.T., Sonoyama, W., Chen, J., Park, S.H. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* **324**:225–236.

Kitamura, C., Kimura, K., Nakayama, T., Terashita, M. (1999). Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. *J. Dent. Res.* **78**:673–680.

Kuo, M.Y., Lan, W.H., Lin, S.K., Tsai, K.S., Hahn, L.J. (1992). Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch. Oral Biol.* **37**:945–952.

Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., Robey, P.G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **12**:1335–1347.

MacDougall, M., Simmons, D., Luan, X., Nydegger, J., Feng, J., Gu, T.T. (1997). Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J. Biol. Chem.* **272**:835–842.

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5807–5812.

Moore, K.A., Lemischka, I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* **311**:1880–1885.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrugghe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**:17–29.

Nosrat, I.V., Widenfalk, J., Olson, L., Nosrat, C.A. (2001). Dental pulp cells produce neurotrophic

factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev. Biol.* **238**:120–132.

Owen, M., Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* **136**:42–60.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143–147.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**:71–74.

Ruch, J.V. (1998). Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem. Cell Biol.* **76**:923–938.

Shi, S., Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* **18**:696–704.

Shiba, H., Nakamura, S., Shirakawa, M., Nakanishi, K., Okamoto, H., Satakeda, H., Noshiro, M., Kamihagi, K., Katayama, M., Kato, Y. (1995). Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells. *Dev. Biol.* **170**:457–466.

Simmons, P.J., Gronthos, S., Zannettino, A., Ohta, S., Graves, S. (1994). Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **389**:271–280.

Simmons, P.J., Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78**:55–62.

Smith, A.J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J.V., Lesot, H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **39**:273–280.

Smith, A.J., Tobias, R.S., Cassidy, N., Plant, C.G., Browne, R.M., Begue-Kirn, C., Ruch, J.V., Lesot, H. (1994). Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch. Oral Biol.* **39**:13–22.

Smith, A.J., Tobias, R.S., Plant, C.G., Browne, R.M., Lesot, H., Ruch, J.V. (1990). In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J. Biol. Buccale* **18**:123–129.

Sonoyama, W., Coppe, C., Gronthos, S., Shi, S. (2005). Skeletal stem cells in regenerative medicine. *Curr. Top. Dev. Biol.* **67**:305–323.

Sveen, O.B., Hawes, R.R. (1968). Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. *Arch. Oral Biol.* **13**:1399–1409.

Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I. (2005). Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch. Oral Biol.* **50**:103–108.

Thesleff, I., Aberg, T. (1999). Molecular regulation of tooth development. *Bone* **25**:123–125.

Thesleff, I., Vaahtokari, A. (1992). The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **88 Suppl 1**:357–368.

Tsukamoto, Y., Fukutani, S., Shin-Ike, T., Kubota, T., Sato, S., Suzuki, Y., Mori, M. (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch. Oral Biol.* **37**:1045–1055.

第9章　骨髓基质来源的间充质干/祖细胞（MSCs）的培养基本原则和鉴定

CARL A. GREGORY and DARWIN J. PROCKOP
Center for Gene Therapy，Tulane University Health Sciences Center，1430 Tulane Avenue New Orleans，70112，LA，USA. Corresponding author：dprocko@tulane. edu

9.1 引言

人间充质干细胞（hMSCs），也被称为骨髓来源的多潜能基质细胞，它具有多能性，在适当的条件下可进行扩增，并且保持向一系列组织谱系分化的潜能，如成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌原细胞、肝细胞，甚至可能在体外分化为神经组织［Friedenstein et al.，1976；Pereira et al.，1995；Pittenger et al.，1999；Sekiya et al.，2002a；Reyes and Verfaillie，2001；Jiang et al.，2002a，b，2003］。20 世纪 70 年代中期，Friedenstein 和他的同事证明 MSCs 可以在体外生长，再移植入体内仍保持分化潜能［Friedenstein et al.，1974］。随后的研究显示，在小鼠体内，MSCs 可长久植入骨、软骨和肺［Pereira et al.，1998］，MSCs 移植入绵羊体内，可分化成软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、心肌细胞、骨髓基质细胞和胸腺基质［Liechty et al.，2000］。其他最新例子包括 MSC 可修复肾脏［Herrera et al.，2004］、肺［Ortiz et al.，2003］和心脏［Mangi et al.，2003］。毫无疑问，这些动物实验使得科学家们开始广泛关注 MSC 在组织修复和基因治疗中的临床应用［Prockop，1997；Bruder et al.，1994］。如今，人体临床实验已经开展，以期治疗多种疾病，如成骨不全［Horwitz et al.，1999，2002］、异染性的脑白质营养不良和赫尔利综合征［Koc et al.，2002］、心肌梗塞［Katritsis et al.，2005］和卒中［Bang et al.，2005］。

人 MSCs 的经典分离方法，为不连续密度梯度离心法分离骨髓细胞后，从单个核细胞层将 MSCs 分离出来［Friedenstein et al.，1976；Pereira et al.，1995；Colter et al.，2000；Sekiya et al.，2002b］。取单个核细胞层进行培养，MSCs 黏附于组织培养容器的塑料表面。通过单层培养，不贴壁的造血细胞逐渐被冲洗掉，得到成纤维细胞样、贴壁、快速增殖的 MSCs。啮齿类 MSCs 的准备和培养方法与之相似，方案仅有少许差异。培养物接近高密度时，MSCs 进入平台期，从纺锤体样的形态转变为较大较平的表型［Sekiya et al.，2002b］。从 2ml 骨髓抽出液中得到的 MSCs 3 周后可被扩增 500 倍，理论上可以得到（1.25～3.55）$\times 10^{10}$ 个细胞，但实验室通常只能得到 1×10^{8} 个细胞［Sekiya et al.，2002b；Gregory et al.，2005a，b］。细胞在扩增过程中保持多潜能性，但该能力会随着过度扩增和不恰当操作而减弱。本章后续部分讲到的鉴定分析用于对培养处理进行补充，介绍在扩增过程中如何评价细胞。本章将介绍从骨髓基质来源功能性的 MSCs 进行直接有效培养的基本知识。

9.2 培养基和试剂的准备

9.2.1 完全培养基（CCM）

α-MEM：α-低限量基础培养基，含谷氨酰胺，无核苷酸或脱氧核苷酸；添加：

(i) 附加 L-谷氨酰胺 ……………………………… 2mmol/L
　　（终浓度，包含组分内的谷氨酰胺共 4mmol/L）

(ii) 经 FBS 杂交瘤纯化，非热灭活 ……………………………… 20%

(iii) 青霉素 ……………………………… 100U/ml

(iv) 链霉素 …………………………………………………………………… 100μg/ml

过滤除菌。储存于4℃，不超过2周。

9.2.2 胰蛋白酶/EDTA

猪胰蛋白酶，0.25%，EDTA，1mmol/L，溶于PBSA

9.2.3 结晶紫溶液

(i) 将结晶紫溶于甲醇中配制成浓度3%（W/V）。

(ii) 在装好0.22μm² 滤膜的500ml真空过滤器中过滤，除去颗粒物质。

9.2.4 骨分化培养基（BDM）

CCM包含5mmol/L β-甘油磷酸，50μg/ml抗坏血酸-2-磷酸和1nmol/L地塞米松（注：准备1000×水储存液时地塞米松中含β-甲基环糊精载体）。过滤除菌。

9.2.5 茜素红S（ARS）溶液

蒸馏水配制1%ARS，用0.5N氢氧化氨调节pH值到4.1，过滤除菌。

9.2.6 脂肪分化培养基（FDM）

(i) 异丁基甲基黄嘌呤（IBMX），1000×储存液，用甲醇配制成0.5mmol/L。

(ii) 吲哚美辛（IM），1000×储存液，用甲醇配制成50mmol/L。

(iii) 地塞米松，1000×储存液，用水配制成0.5mmol/L。（注：地塞米松中含β-甲基环糊精载体）

(iv) FDM：CCM（见9.2.1节）中含0.5μmol/L IBMX，50μmol/L IM和0.5μmol/L地塞米松。

9.2.7 油红O（ORO）工作液

(i) ORO用异丙醇配制成1%（W/V） ………………………………… 3份

(ii) PBSA ……………………………………………………………… 2份

(iii) 70μm细胞滤网过滤

9.2.8 BMP-2和BMP-6储存液（100×）

(i) 用无菌PBSA溶解骨形成蛋白（BMPs），浓度为50μg/ml。

(ii) 取10或50μl的倍数体积分装于0.5ml离心管中，储存于－20℃。

9.2.9 TGF-β3储存液（100×）

(i) 用无菌PBSA溶解TGF-β3，浓度为1μg/ml。

(ii) 取10或50μl的倍数体积分装于0.5ml离心管中，储存于－20℃。

更换培养基时每个培养物需要5μl储存液。

9.2.10 软骨细胞分化培养基（CDM）

高葡萄糖 DMEM 中含：

(i) 地塞米松 …………………………………………… 1×10^{-7}mol/L（见 9.2.6 节）

(ii) 抗坏血酸-2-磷酸 …………………………………………… 50μg/ml

(iii) 脯氨酸 …………………………………………… 40μg/ml

(iv) 丙酮酸盐 …………………………………………… 100μg/ml

(v) ITS 混合物 …………………………………………… 50μg/ml

(vi) 过滤除菌

9.3 分离人骨髓细胞用于 MSCs 扩增

尽管从小梁骨［Sakaguchi et al.，2004］、滑膜［Sakaguchi et al.，2005］、脂肪组织［Zuk et al.，2002］，甚至剥脱的牙齿中［Miura et al.，2003；见第 8 章］均可得到 MSC 样细胞，但是髂骨骨髓抽出液仍是分离和扩增 hMSCs 最常用的组织。2ml 骨髓抽出液中可得到足够数量的 MSCs，能满足大多数情况下使用。骨髓抽出液应该由专业操作人员按认可的临床方案进行处理，此方案本章未涉及。骨髓储存于装有 3ml α-低限量基础培养基的肝素抗凝管中，冰上保存，处理前最多放置 8h。4℃放置更长时间会降低 MSCs 的增殖能力，所以不推荐。大鼠骨髓细胞的准备和 MSCs 的分离见 9.7 节。

9.4 处理人骨髓细胞用于 MSCs 培养

处理人骨髓细胞的起始步骤，按方案 9.1. 所示，用 Ficoll 不连续密度梯度离心法富集骨髓中的有核组分，它们包含造血干细胞和间充质干细胞，继而将骨髓细胞置于 15cm 组织培养皿中培养，或者收集于组织培养皿后，使细胞在 Nunc 细胞工厂中扩增，期间频繁润洗和更换培养基。培养物中不贴壁的造血组分几天后被逐渐冲洗掉，只留下单一组分的贴壁的 MSCs。

处理人来源细胞的所有工作应当在Ⅱ级微生物安全通风橱中进行。

方案 9.1 人骨髓不连续密度梯度离心用于 MSCs 生产

试剂和材料

无菌

☐ 完全培养基（CCM；见 9.2.1 节）

☐ 无钙或镁的磷酸盐缓冲液

☐ 无钙或镁的 Hank's 平衡盐溶液

☐ Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液

☐ 聚丙烯离心管，15ml 和 50ml

☐ 塑料组织培养皿，直径 15cm
☐ 塑料微量移液器枪头，10μl

非灭菌

☐ 0.85％台盼蓝盐溶液
☐ 微量离心管
☐ 带吊桶式转头的低温台式离心机
☐ 水浴箱调至 37℃
☐ 改良的 Neubauer 血细胞计数器
☐ 微量移液器，Eppendorf P20 或同等使用的移液器

步骤

(a) 去除抗凝管盖子，将骨髓液转移至 50 ml 离心管中。加入室温的 HBSS，确保体积达到 25 ml。

(b) 取另一个 50 ml 离心管，加入 20 ml Ficoll-paque 淋巴细胞分离液，将 25 ml 细胞悬液轻轻加到 Ficoll 上层。HBSS 与 Ficoll 间的界面不能被破坏。

(c) 关闭闸，室温 1800*g* 离心 30min。

(d) 离心完毕，于 Ficoll 和 HBSS 的界面收集白色细胞层（图 9.1；彩图 13），将其移至新的 50ml 离心管中。

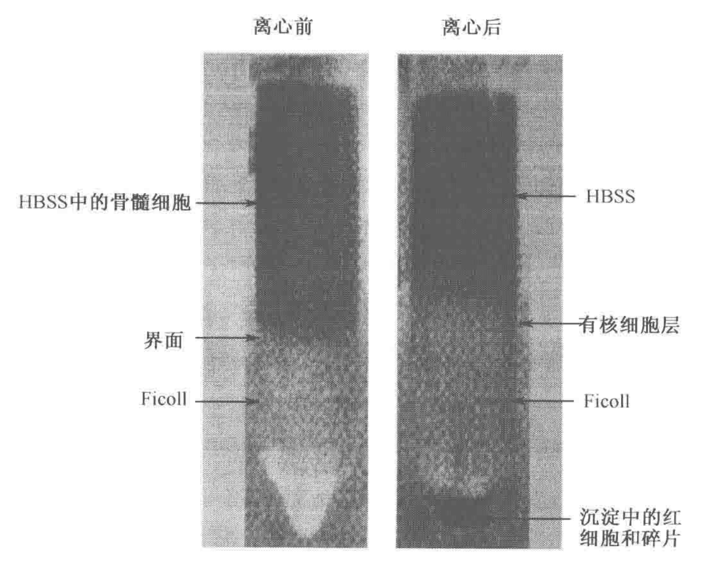


图 9.1　啮齿类和人骨髓细胞的处理

用于分离人骨髓中单个核组分的不连续 Ficoll 梯度离心前后的图片。单个核细胞取自两层界面处的白膜层（亦见彩图 13）

(e) 用 HBSS 将收集到的细胞悬液体积调至 3 倍，室温 1000*g* 离心 10min。重复洗涤。

(f) 用 30ml 预热至 37℃的 CCM 重悬细胞。

（g）取 10μl 细胞悬液加入到 10μl 台盼蓝中，血细胞计数器评价细胞的存活率，存活率需高于 80%。

（h）将 30 ml 细胞悬液移至直径 15cm 组织培养皿中，于 5%CO_2 培养箱中培养至少 15h。

（i）从培养箱中取出培养皿，吸出培养基。

（j）加入 20ml 预热的 PBSA，润洗单层细胞，弃去。

（k）重复润洗过程 3 次。

（l）加入 30ml 预热的新鲜 CCM。

（m）每隔一天重复此润洗和更换培养基操作，共 6 天。

（n）6 天后，在倒置显微镜下观察单层细胞，贴壁的、成纤维细胞样 MSCs 克隆在培养皿中清晰可见（图 9.2a 和 b）。有时可能有造血细胞污染的迹象，但这些细胞可以在传代时被去除。培养物达到 50%～60%汇合时，按 9.5 节进行处理。

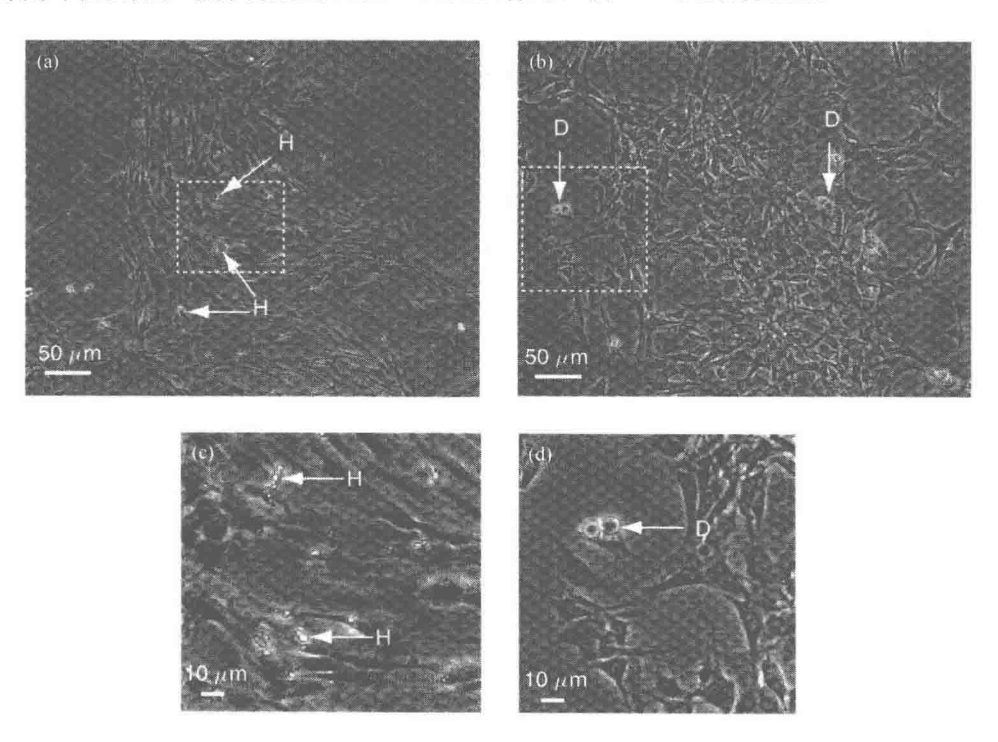


图 9.2　骨髓培养所得的 MSCs 集落

图中的显微照片（a）和（b）示骨髓单个核细胞贴壁后形成的集落。两个集落均包含小而圆的细胞，可能为造血来源（箭头 H 示）。分裂中的 MSCs 一般为双联体形式，很容易被误认为是污染的造血细胞（箭头 D 所示），但分裂中的 MSCs 比造血细胞大。图（c）和（d）分别为图（a）和（b）虚线框内的放大图片，冲洗单细胞层、更换培养基和传代后，污染的细胞被去除，可见成纤维细胞样、贴壁的 MSCs 和许多分裂中的 MSC。

9.5 MSCs 培养物的扩增和冻存

9.5.1 人骨髓来源的 MSCs 的扩增

尽管 MSCs 的获得因供者和物种不同而有所不同，但是在正确的培养条件下 3 周时间大约可以将 MSCs 扩增至 500 倍 [Sekiya et al.，2002b；Gregory et al.，2005a，b]。采用低密度接种加传代即可实现。缩小细胞培养体积试验证明，MSCs 最好培养于直径 15cm 的 Nunclon 或 Corning 板中，面积在 $140cm^2$ 和 $150cm^2$ 之间。细胞产率取决于培养皿的数量，一般使用此方法传代，每个培养皿中可收获 5×10^5 个细胞。大规模生产时，通常采用总面积达 $6320cm^2$ 的 Nunclon 细胞工厂®，可在 10 天左右快速生产出超过 5×10^7 个细胞。因为细胞工厂可被作为完全密封设备使用，经常被用于扩增临床使用的细胞。本章集中讲述标准培养皿在扩增 MSCs 中的使用，因为该方法最适合一般研究使用，原则上，研究者选择细胞工厂扩增 MSCs 时方案是相同的。

MSCs 的获得因啮齿类的种属不同而有所差别，从 Lewis 大鼠可得到重复性较好的结果 [Javazon et al.，2001]。本章集中讲述大鼠细胞的分离和扩增，原因是培养相对容易且与 hMSCs 相似。小鼠 MSCs 的培养复杂，该领域的研究者就标准方案尚未达成一致。小鼠 MSCs 样细胞的扩增有多种方案可以实现，它们之间互不相同，且区别于大鼠和人 MSCs 持续培养的标准方法 [Phinney et al.，1999；Jiang et al.，2002；Baddoo et al.，2003；Peister et al.，2004]。

方案 9.2 间充质干细胞（MSCs）的传代培养

试剂和材料

无菌

- □ 完全培养培养基（CCM；见 9.2.1 节）
- □ PBSA
- □ 胰蛋白酶/EDTA（见 9.2.2 节）
- □ 聚丙烯离心管，15ml 和 50ml
- □ 塑料组织培养皿，直径 15cm
- □ 塑料微量移液器枪头，10～1000μl

非灭菌

- □ 0.85%台盼蓝盐溶液
- □ 改良的 Neubauer 血细胞计数器
- □ 微量移液器，Eppendorf P10，P100 和 P1000 或同等使用的移液器

步骤

(a) 检查按照方案 9.1 所得的 MSCs。如果培养物中小的、贴壁、纺锤形的成纤维

细胞样细胞汇合至 60%（见图 9.3d）时，对其进行处理。如果单层细胞稀疏（见图 9.3c），按方案 9.1 所示继续润洗和更换培养基。

(b) 按如下步骤消化单层细胞：

(i) 用 20ml 预热的 PBSA 润洗单层细胞后，加入 5ml 胰蛋白酶/EDTA。

(ii) 将培养皿置于 37℃ 2min，在 10×放大倍数视野下观察单层细胞。贴壁细胞应正从塑料培养瓶上脱落。

(iii) 将培养皿置于 37℃ 2min，再次观察。重复观察直到 90% 的 MSCs 已从培养瓶中脱落下来。

(iv) 加入 5ml CCM，将 10ml 悬液移至 15ml 离心管中，500*g* 离心 10min。

(v) 离心完毕，弃去上清，每管用 1～2ml 预热的 PBSA 重悬沉淀。如有必要，混合多管细胞悬液只进行一次细胞计数。

(c) 取 10μl 细胞悬液加入到 10μl 台盼蓝中，用血细胞计数器进行计数。合适的细胞悬液浓度为 $(2\sim5)\times10^5$ 个细胞/ml，存活率需高于 80%。胰蛋白酶消化后用于传代的早期培养物悬液，亦可进行集落形成单位（CFU）测定（见方案 9.5）、冻存（见方案 9.3）或分化测定（见方案 9.6，9.7 和 9.8）。

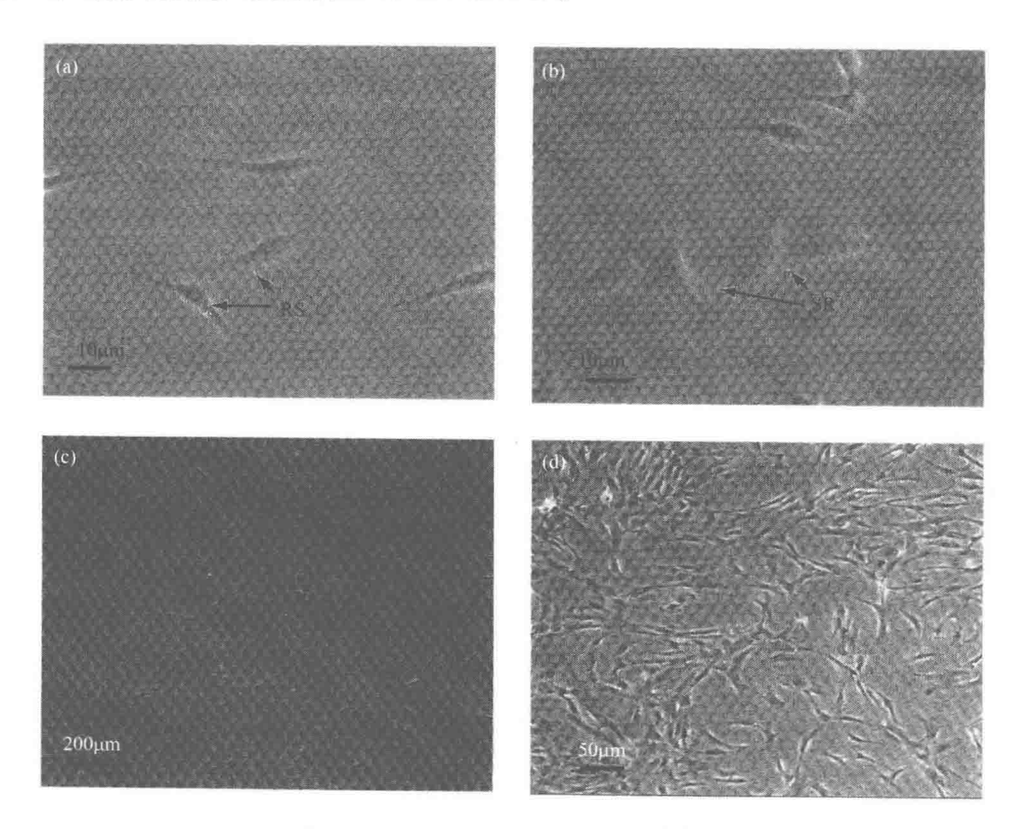


图 9.3　MSCs 的形态和合适的传代密度

(a) 纺锤形的 RS 型 MSCs；(b) 较大的 RS 形状的 MSCs，含有较多菱形的细胞；(c) 较早代数的 MSCs，大多数为 RS 型细胞；(d) 处于合适传代密度的单层细胞。

(d) 将细胞以 50～100 个细胞/cm 的密度接种到培养皿中，保持低密度以保证快速

的自我更新和多潜能特性。用预热 CCM 以 7×10^3（最终密度为 50 个细胞/cm^2）到1×10^4（最终密度为 100 个细胞/cm^2）的密度重悬 MSCs。

(e) 预备适当数量的 15cm 培养皿，加入 25ml 预热的 CCM。

(f) 接种 1 ml 步骤（b）和（c）所得的细胞悬液。来回滑动平皿（勿打圈）使细胞分布均匀。培养皿置于培养箱中，标记为一代细胞。

(g) 培养 2～3 天后，观察并评价形态。MSCs 应为小的、纺锤体形状，频繁折光的双联体（例见图 9.2b）。此为培养良好的 MSCs（亦见 9.8 节）。

(h) 从培养皿中吸出培养基，用 20ml 预热的 PBSA 润洗，加入 25ml 预热的新鲜 CCM。

(i) 每次传代时所需的培养皿数量取决于可以接种的细胞数量。方案中的上述体积适用于 MSCs 接种至单个 15cm 培养皿。如有需要可按此例扩大以接种多个培养皿。

9.5.2　MSCs 的冻存和复苏

MSCs 另一个特性为它们可以保存在液氮中，并易于复苏以进一步扩增。冻存时，细胞用含二甲亚砜（DMSO）和高浓度 FBS 的冻存液重悬。成功的冻存方法为，将细胞悬液缓慢冷却至－80℃后，快速转移到液氮罐中，在此接近－150℃的环境下可至少保存 3 年。

方案 9.3　间充质干细胞（MSCs）的冻存

试剂和材料

☐ α-MEM（见 9.2.1 节）
☐ FBS（见 9.2.1 节）
☐ 组织培养级二甲亚砜（DMSO）
☐ 冻存液（上述组分）：含 30％FBS 和 5％DMSO 的 α-MEM。过滤除菌（为进一步确保安全和使冻存液澄清。高浓度血清和 DMSO 混合时冻存液会变混浊）
☐ 聚丙烯离心管，15 ml 和 50 ml
☐ PBSA
☐ 0.22μm 滤膜的真空过滤器，50ml
☐ 冻存管，2ml
☐ 微量移液器枪头，用于 Eppendorf P10，P100 和 P1000 或同等使用的移液器

非灭菌

☐ 异丙醇 99.5％
☐ 调至 37℃的水浴箱或同等设备
☐ 微量移液器枪头，用于 Eppendorf P10，P100 和 P1000 或同等使用的移液器
☐ Nalgene Cryo-1℃冻存容器

☐ Thermo ULT −80℃低温冰箱或同等设备
☐ 装满医用级别液氮的液氮罐

步骤

(a) 按方案 9.2 中步骤（b）、（c）所得的 MSC 细胞悬液，500*g* 离心 10min。

(b) 在冻存管上标记细胞来源、日期和细胞代数。

(c) 用预热的冻存液以 1×10^6 个细胞/ml 的密度重悬沉淀，每个冻存管中加入 1ml，分装成若干管。在 DMSO 存在的情况下，勿使 MSCs 在室温放置 20min 以上。

(d) 向 Cryo −1℃冻存容器内装入异丙醇至刻度线，将冻存管置于容器内。

(e) 将容器置于−80℃至少 15h。

(f) 将冻存管转移至液氮，至少可保存 3 年。

方案 9.4　冻存间充质干细胞（MSCs）的复苏

试剂和材料

无菌

☐ CCM：（见 9.2.1 节）
☐ 塑料组织培养皿，15cm
☐ PBSA
☐ 微量移液器枪头，用于 Eppendorf P10，P100 和 P1000

非灭菌

☐ 调至 37℃的 Fisher Scientific Isotemp 水浴箱
☐ 微量移液器枪头，用于 Eppendorf P10，P100 和 P1000 或同等使用的移液器

步骤

(a) 准备 2 个 15cm 培养皿，加入 25ml 预热的 CCM。

(b) 从液氮罐中取出所需的冻存管。将冻存管放入 37℃水浴箱中解冻。此步骤需小心操作，戴好面罩。因为储存时出现问题，解冻的冻存管可能爆裂。

(c) 细胞悬液融化后，取 450μl 加入每个培养皿中，在 37℃，5% CO_2 培养箱中至少培养 18h。

(d) 第二天，用 30ml 预热的 PBSA 润洗细胞，然后加入 30ml 预热的 CCM。

(e) 按方案 9.2 所述进行传代处理。

9.6　鉴定

因为 MSCs 的培养具有一定程度的异质性，所以不容易通过细胞表面抗原的组成特

性加以定义。由于这些限制，培养中的MSCs最好通过克隆形成试验和向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞的三系分化能力进行评估。但是，细胞表面标记分析有利于分析造血细胞的污染程度。

9.6.1 MSCs的流式细胞术分析

尽管MSCs不易以细胞表面抗原为基础进行定义，但是流式细胞术有利于在某些情况下对MSCs进行鉴定。例如，前向角和侧向角散射的简单测定可以告诉我们，在MSCs群体中（见9.8.1节），较小的快速自我更新（RS）型细胞和缓慢复制（SR）细胞的比例。与较大的较复杂的SR细胞相比，RS细胞典型的呈现为较低的前向角和侧向角散射谱。举例见［Sekiya et al.，2002b］和［Smith et al.，2004］，均提供了详细的方案。

流式细胞术在MSCs鉴定中的主要用途在于确定培养物没有造血细胞污染。与国际细胞治疗学会一致，人MSCs培养物中以下标记应为阴性：白细胞标记CD45（Beckman Coulter，clone IgG1 J.33）、内皮和造血细胞标记CD34（Beckman Coulter，clone IgG1 581）、单核/巨噬细胞标记CD14（Beckman Coulter，clone IgG2a RMO52）和CD11b（Beckman Coulter，clone IgG1 Bear1）、B细胞标记CD79a（clone IgG1 HM47，需固定和透化）和CD19（clone IgG1 J 4.119）。除非用干扰素γ刺激，MSCs不应表达HLA Ⅱ类分子（BD Biosciences，clone IgG2a TÜ36）。MSCs表达CD105（即BD Biosciences clone IgG1 AD2）和CD90（即Thy1，Beckman Coulter clone IgG1 Thy1/310）。

9.6.2 MSCs的克隆形成试验

MSCs最重要的特性之一是在培养过程中具有自我更新能力。MSCs的自我更新能力可以用多种方法进行评价，如标记核苷酸掺入法、血细胞计数器计数和流式细胞术分析，最广泛接受的方法为CFU能力的评估［Digirolamo et al.，1999］。进行CFU测定时，MSCs培养物用胰蛋白酶消化回收，血细胞计数器计数。将100个细胞加入含有CCM的15cm组织培养皿中，使细胞在正常条件下贴壁和扩增。

3周后，将CFU培养润洗、固定后用结晶紫染色。计算集落数和贴壁效率。尽管可以利用在96孔培养板中接种单个细胞的复杂CFU测定方法［Smith et al.，2004］，标准的CFU测定仍然是检测MSCs复制潜能的一贯的可靠方案。

方案9.5 MSCs自我更新的集落形成单位测定

试剂和材料

无菌

☐ CCM（见9.2.1节）

☐ PBSA

☐ 0.85%台盼蓝盐溶液

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见9.2.2节）

☐ 聚丙烯离心管，15ml 或 50ml
☐ 塑料组织培养皿，直径 15cm
☐ 移液器枪头

非灭菌
☐ 结晶紫溶液（见 9.2.3 节）
☐ 蒸馏水
☐ 改良的 Neubauer 血细胞计数器
☐ 移液器，Eppendorf P10，P100 和 P1000

步骤

(a) 按方案 9.2 所示进行 MSCs 收集和传代。对悬液中的剩余细胞重新计数以确保准确性。

(b) 用 CCM 制备浓度为 1000 个细胞/ml 的 MSCs 悬液。

(c) 准备 3 个 15cm 培养皿，每个加入 25ml 预热的新鲜 CCM。

(d) 向每个培养皿中加入 100μl 悬液（100 个细胞），晃动培养皿使细胞分布均匀，在 37℃，5% CO_2环境下孵育 3 周。

(e) 3 周后，从 CFU 培养物中吸出培养基，用 PBSA 润洗培养皿 3 次。

(f) 每个培养皿中加入 10 ml 结晶紫溶液，室温孵育 5～10min。

(g) 吸出染液，用蒸馏水润洗，直到背景被清除。

(h) 计数每个培养皿中的集落数，取其平均值，计算贴壁率或“CFU 潜能”（形成的 CFU 相对于接种个数的百分比）。培养良好的 MSCs 一般 CFU 潜能大于 40%。

9.6.3 MSCs 的成骨性分化

MSCs 通过体外分化为矿化的成骨样细胞的潜能加以定义。在成骨培养基中孵育汇合的 MSCs 单层细胞 10～21 天，将矿化的单层细胞进行茜素红 S（ARS）染色进行评价，可显示钙化的基质（图 9.4a；彩图 10A）。半定量检测时，将 ARS 从单层细胞中提取出来，分光光度法测定 [Gregory et al., 2004]。其他成骨检测方法如碱性磷酸酶的测定 [Gunn et al., 2005] 和直接的钙测定 [Gregory et al., 2004] 也在本章加以介绍。

方案 9.6　MSCs 分化为矿化的成骨细胞

试剂和材料

无菌
☐ CCM（见 9.2.1 节）
☐ BDM（见 9.2.4 节）
☐ PBSA

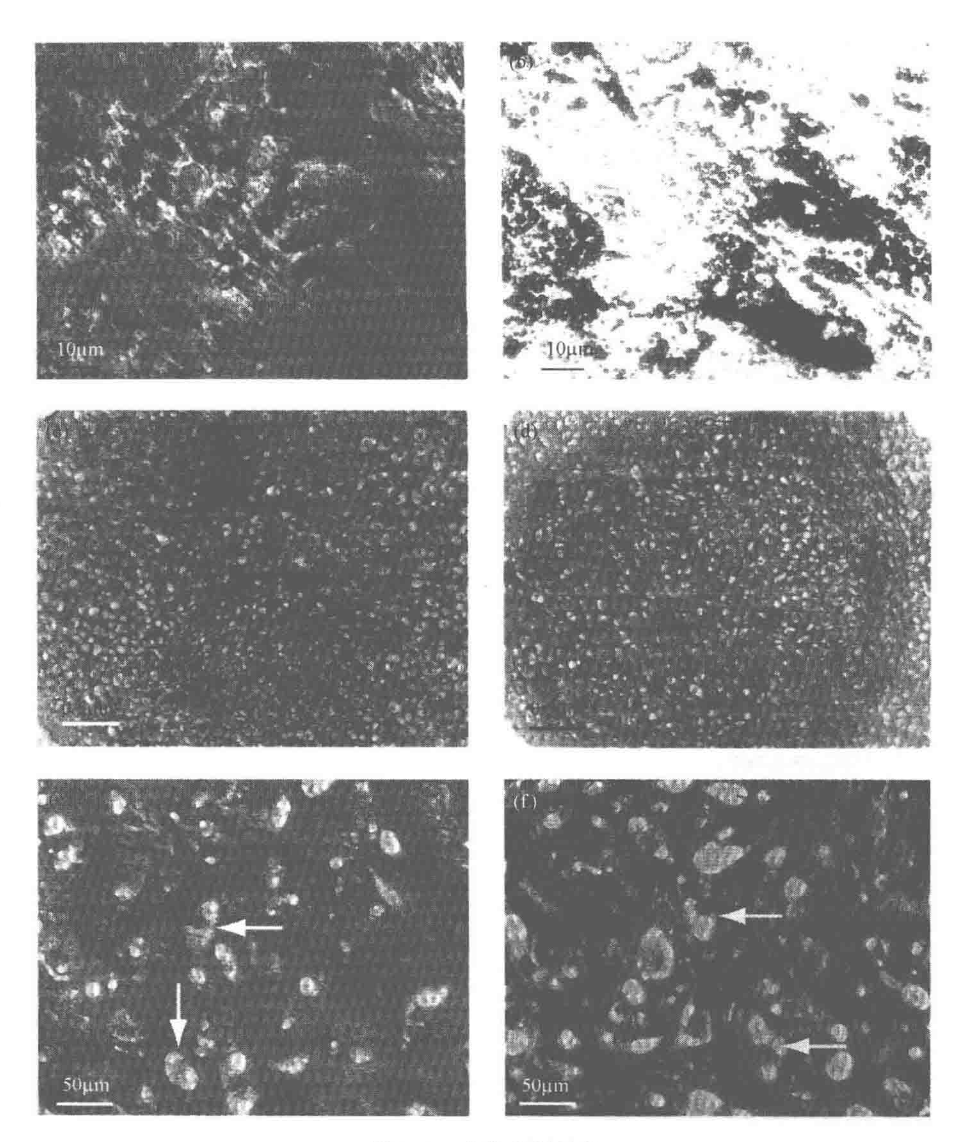


图 9.4　分化检测结果

(a) 茜素红 S 染色的单层成骨分化的 MSCs；(b) 油红 O 染色的单层成脂分化的 MSCs；(c～f) 成软骨分化沉淀物的染色，10μm 切片：(c，e) 甲苯胺蓝，(d，f) 番红 O。高倍镜 (e，f) 示软骨细胞构成的软骨和陷窝（箭头）的形态（亦见彩图 10）。

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 9.2.2 节）

☐ 聚丙烯离心管，15ml 和 50ml

☐ 组织培养板，6 孔，孔面积为 9.6cm²

非灭菌

☐ ARS（见 9.2.5 节）

☐ 福尔马林缓冲液，10%

☐ 改良的 Neubauer 血细胞计数器

步骤

(a) 按方案 9.2 所示从单层细胞中收集 MSCs。

(b) 向 6 孔培养板的每个孔中加入 2ml CCM，共有 1×10^4 个细胞（适用于人或大鼠）。最终密度约 1×10^3 个细胞/ cm^2

(c) 将上排 3 个孔标记为“成骨”，下排 3 个孔标记为“阴性”。

(d) 在 37℃，5% CO_2 环境下孵育，每隔两天更换一次培养基，直到细胞达到 70%～80% 汇合。

(e) 达到所需的细胞密度时，从孔中吸出完全培养基，向 6 孔培养板上排的孔（标记为“成骨”）中加入 2ml BDM，向下排的孔（标记为“阴性”）中加入 2ml CCM。

(f) 在 37℃，5% CO_2 环境下孵育，每隔两天更换一次培养基。ARS 检测时，于 21 天对细胞进行染色。

  (i) 从培养箱中取出分化后的 MSC，每孔中的单层细胞用 2ml PBSA 润洗两次。

  (ii) 每孔中加入 2ml 福尔马林，室温固定单层细胞 10min。

  (iii) 吸出福尔马林，每孔中加入 2ml PBSA 润洗两次后，再用 2ml 蒸馏水润洗一次。

  (iv) 加入 2ml ARS 溶液，室温孵育 30min。

  (v) 过量蒸馏水润洗各孔，直到“阴性”孔中的背景染色最大限度地清除。

(g) 用显微镜观察标记为“成骨”的单层细胞评价深红染色的程度。成骨分化达到令人满意的水平时，单层细胞 ARS 着色面积超过 50%。此时，单层细胞可在 4℃水中最多存放 7 天。或者，ARS 可从着色的单层细胞中提取出来，用先前描述的方案进行测定 [Gregory et al.，2004]。

9.6.4　MSCs 的成脂性分化

在适当的条件下，MSCs 可被诱导为包含脂滴的脂肪细胞。实现成脂性分化的方法与成骨性诱导的方法相似，但培养基组成不同。成脂培养基培养 14～21 天后，在相差显微镜下脂滴模糊可见，但用亲脂性染料油红 O（ORO）染色后，可清晰地将脂滴同周围的细胞体区分开。和 ARS 相同，ORO 染料可提取出来进行半定量检测，用分光光度计进行测定 [Gregory et al.，2005c]（图 9.4b；彩图 10B）。

方案 9.7　MSCs 分化为脂肪细胞

试剂和器材

无菌

□ CCM（见 9.2.1 节）

□ FDM（见 9.2.6 节）

☐ PBSA
☐ 聚丙烯离心管，15ml 和 50ml
☐ 组织培养板，6 孔，孔面积为 9.6cm^2
☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 9.2.2 节）

非灭菌
☐ 0.85%台盼蓝盐溶液
☐ 中性福尔马林缓冲液
☐ ORO 工作液（见 9.2.7 节）
☐ 改良的 Neubauer 血细胞计数器

步骤

(a) 按方案 9.2 所示从单层细胞中收集 MSCs。

(b) 向 6 孔培养板的每个孔中加入 2ml CCM，共含有 1×10^5 个细胞。最终密度约 1×10^3 个细胞/ cm^2。

(c) 将上排 3 个孔标记为“成脂”，下排 3 个孔标记为“阴性”。

(d) 在 37℃，5% CO_2 环境下孵育，每隔两天更换一次培养基，直到细胞达到 70%～80%汇合。

(e) 达到所需的细胞密度时，从孔中吸出完全培养基，向 6 孔培养板上排的孔（标记为“成脂”）中加入 2ml FDM，向下排的孔（标记为“阴性”）中加入 2ml CCM。

(f) 在 37℃，5% CO_2 环境下孵育，每隔两天更换一次培养基。ORO 染色检测时，于 21 天按如下方法对细胞进行染色：

(i) 从培养箱中取出分化后的 MSCs，每孔中单层细胞用 2ml PBSA 润洗两次。

(ii) 每孔中加入 2ml 福尔马林，室温固定单层细胞 10min。

(iii) 吸出福尔马林，每孔中加入 2ml PBSA 润洗两次后，再用 2ml 蒸馏水润洗一次。

(iv) 加入 2ml ORO 工作液，室温孵育 30min。

(v) 过量 PBSA 润洗各孔，直到“阴性”孔中的背景染色最大限度地清除。

(g) 用显微镜观察标记为“成脂”的单层细胞评价脂滴的染色程度。成脂分化达到令人满意的水平时，单层细胞 ORO 着色面积超过 30%。此时，单层细胞可在 4℃ PBSA 中最多存放 7 天。或者，将 ORO 从着色单层细胞中提取出来，用先前描述的方案进行测定 [Gregory et al.，2005c]。举例见图 9.4b 和彩图 10B。

9.6.5 MSCs 的成软骨分化

（仿 Johnstone et al.，1998 和 Sekiya et al.，2002a，2005 ）

在简单的微团培养体系中，软骨培养基培养的 MSCs 可以形成软骨质沉淀物。在此测定方法中，2×10^5 MSCs 用 500μl 成软骨培养基重悬后，离心形成沉淀。置于培养箱中 2～3 天后，扁平的沉淀形成粗糙的球状结构。21 天后，组织学观察，沉淀由包含Ⅱ

型胶原和丰富的硫酸化蛋白聚糖的透明样软骨组成。MSCs 存在于不同空隙。为达到令人满意的软骨诱导，成软骨培养基中可补充骨形成蛋白 2 或 6。尽管一些研究者报道在诱导软骨生成时，BMP2 比 BMP6 更有效 [Sekiya et al.，2005]，MSCs 可能以供者依赖的方式倾向任一 BMP。对于新鲜制备的 MSCs，建议同时使用 BMP2 和 BMP6 进行软骨生成试验。

方案 9.8　MSCs 分化为软骨结构

试剂和材料

灭菌

☐ CCM（见 9.2.1 节）

☐ BMP2 和 BMP6 储存液（100×）（见 9.2.8 节：每次换液时每种培养物需 5μl 储存液）

☐ TGF-β3 储存液（100×）（见 9.2.9 节）：每次换液每种培养物需要 5μl 储存液）

☐ CDM（见 9.2.10 节）

☐ 聚丙烯离心管，15ml 和 50ml

☐ PBSA

☐ 0.85%台盼蓝盐溶液

☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 9.2.2 节）

非灭菌

☐ 甲苯胺蓝硼酸盐和番红 O 染色

☐ 改良的 Neubauer 血细胞计数器

步骤

(a) 按方案 9.2 所示从单层细胞中收集 MSCs。用预热的 CDM 重悬细胞，使其密度为 4×10^5 个细胞/ml，吸出 500μl 悬液加入所需的 15ml 聚丙烯管中。

(b) 每管中加入 5μl BMP 储存液和 5μl TGF-β3 储存液，轻轻摇动混匀。

(c) 500*g* 离心 10min 沉淀细胞，于 37℃，5% CO_2 环境下孵育 2～4 天，扁平的沉淀变为黏性，出现粗糙的球状结构。

(d) 此时，用移液枪从沉淀中轻轻吸出培养基，加入含 BMP 和 TGF-β3 的 CDM。将培养物重新放回培养箱。

(e) 每 2～3 天更换培养基，至 21 天止。

(f) 21 天后，PBSA 润洗沉淀，用 10%福尔马林缓冲液固定。

(g) 将沉淀浸入石蜡中，做 10μm 切片，按照标准的组织化学方法进行甲苯胺蓝硼酸盐和番红 O 染色。两种组织化学法染色后软骨间空隙应清晰可见。硫酸化蛋白聚糖经甲苯胺蓝硼酸盐染色后显示紫色，番红 O 染色后显示桃红色（举例见图 9.4，c-f 和彩图 10，C～F)。

9.7 附加方案：大鼠 MSCs 的获得和扩增

9.7.1 大鼠骨髓的收集

大鼠 MSCs 的培养基本上与人 MSCs 的培养方法相同，只有少许差异。人和大鼠 MSCs 扩增方案的主要区别是，大鼠 MSCs 最好在单层细胞 40%～50%汇合时传代，而人的细胞可以在密度达到 50%～60%汇合后传代。这是因为，培养中过度的细胞间接触会使大鼠 MSCs 的增殖和多向分化潜能显著下降。收集大鼠 MSCs 时，骨髓细胞应取自新处死动物的长骨。用生长培养基冲洗骨可得到骨髓。

方案 9.9 收集大鼠骨髓用于 MSCs 生产

试剂和器材

灭菌

- ☐ CCM（见 9.2.1 节）含 0.2μg/ml 两性霉素 B（两性霉素 B 洗剂）
- ☐ 纱布
- ☐ 含 100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 0.2μg/ml 两性霉素 B 的 PBSA
- ☐ 无镁和钙的 Hank's 平衡盐溶液（HBSS）
- ☐ 塑料 Petri 培养皿，15cm 直径
- ☐ 装有＃10 和＃15 刀片的解剖刀
- ☐ 1 和 2 英尺刀刃的手术剪
- ☐ 镊子
- ☐ 止血钳
- ☐ 15cm 刀刃的咬骨钳
- ☐ 带 Luer 接头的注射器，20ml
- ☐ 皮下注射针，23 号和 18 号
- ☐ 微量离心管，1.5ml 和 0.5ml
- ☐ 聚丙烯离心管，15ml 和 50ml

非灭菌

- ☐ 成年 Lewis 大鼠
- ☐ CO_2啮齿动物安乐死小室
- ☐ Eppendorf 5417C 微量离心器或同等设备

步骤

(a) CO_2窒息处死动物，切勿使用药物。

(b) 用酒精擦拭后肢，在不破坏股骨的情况下解剖后肢。将股骨从肢体中分离

出来。

(c) 切除股骨上的肌肉和肌腱。用无菌纱布擦拭除去骨上的剩余组织。

(d) 用酒精擦拭已清理干净的骨，将其放入 50ml 塑料管中。

(e) 用含抗真菌药物的冰浴 CCM 浸没骨，直到骨髓提取准备完毕。从分离骨到骨髓提取的时间应尽量缩短。

(f) 装有股骨的离心管移至微生物安全厨中，将骨放入 15cm petri 培养皿中。

(g) 按如下步骤提取骨髓：

　(i) 用咬骨钳剪掉骨的两端，暴露内部骨髓。

　(ii) 装有 23G 针头的注射器中吸入 5ml 含抗真菌药物的 CCM，向 50ml 离心管中冲洗每根股骨。

　(iii) 吸取冲洗后的 CCM，反复冲洗股骨 3 次，将其转移至 15ml 离心管中。

　(iv) 1000*g* 离心，用 1ml 含抗真菌药物的 CCM 重悬骨髓沉淀。

　(v) 在 15ml 离心管中将 1ml 骨髓细胞悬液加入到 4ml 含抗生素和抗真菌药物的新鲜 PBSA 中。每根股骨所得的 5ml 细胞悬液可混合于同一个离心管中。

(h) 在 10℃ 1000*g* 离心骨髓细胞 10min，用 10ml 含抗生素和抗真菌药物的 PBSA 洗涤细胞 3 次。

(i) 最后，用 5ml CCM 重悬骨髓细胞，在按照方案 9.10 操作前置于冰上。

9.7.2 大鼠骨髓细胞的培养

啮齿类骨髓一般直接悬浮于培养基来收集 MSC，无需进一步纯化。大鼠骨髓细胞的培养可以使用人细胞的培养基，但是培养的前几天需加入抗生素（见方案 9.10）。

方案 9.10　大鼠骨髓原代培养用于 MSCs 生产

试剂和器材

灭菌

☐ CCM（见 9.2.1 节）含 0.2μg/ml 两性霉素 B（两性霉素 B 洗剂）

☐ 聚丙烯离心管，15ml 或 50ml

☐ PBSA

☐ 塑料组织培养 Petri 培养皿，直径 15cm

非灭菌

☐ 0.85％台盼蓝盐溶液

☐ Eppendorf 5417C 微量离心器或同等设备

☐ 改良的 Neubauer 血细胞计数器

步骤

(a) 从一根股骨所得的骨髓悬液中取出 10μl，与 10μl 台盼蓝混合（见方案 9.9）。评估存活率，确保高于 80%。

(b) 1000g 离心 10min 沉淀骨髓。

(c) 用 25ml 预热的含抗真菌药物的 CCM 重悬骨髓（处理大鼠骨髓细胞使用抗真菌药物，人骨髓细胞不使用）。

(d) 将 25ml 细胞悬液加入到 15cm 直径的组织培养板中，37℃，5% CO_2环境下至少孵育 15h。

(e) 从培养箱中取出培养板，吸出培养基。

(f) 用 20ml 预热的 PBSA 润洗单层细胞。重复润洗过程 3 次，将最后的洗涤产物加入 30ml 预热的含抗菌药物的新鲜 CCM 中（只有大鼠细胞使用抗真菌药物）。

(g) 如有需要每隔两天重复步骤（f），维持 6～14 天。

(h) 每 3 天用倒置显微镜观察单层细胞。贴壁、成纤维细胞样的 MSCs 集落可以在培养板中清晰可见。某些情况下，这可能是造血细胞污染的信号，但这些细胞随着细胞传代过程可被去除（图 9.2）。当培养物达到 40%～50%汇合时（见图 9.3d），按照 9.5 节方案处理。这些 MSCs 标记为 0 代。

9.8 MSCs 扩增技术注释

9.8.1 MSCs 形态注释

若处理不当，培养中的 MSCs 会对环境产生过度反应并且快速衰老。而且，在极少数情况下，MSCs 以供者依赖的方式自发衰老。培养中，评价 MSCs 质量最便捷的方法就是简单的形态学观察。细胞处于快速分裂的状态，培养良好的 MSCs 显示较小的、纺锤体状的形态，伴有较多的折光的双联体，为新的正在分裂的细胞（图 9.2b）。这些细胞称为 RS 或"快速自我更新的细胞"（图 9.3a），一般具有较强的克隆形成能力和更好的向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化的潜能 [Sekiya et al., 2002b]（参见 9.6.1 节）。由于处理不当、过度传代、高密度铺板或供者依赖的原因，培养中的 MSCs 出现衰老时，细胞显示被称为 SR 或"缓慢增殖"的形态（图 9.3b）。这些 MSCs 通常较大、呈菱形，有时候，伴随少量新增殖的折光双联体。通常这些细胞克隆形成能力较差，分化试验时表现很差 [Sekiya et al., 2002b]。

9.8.2 MSCs 培养密度注释

MSCs 应以低密度培养以保持其多潜能特性。汇合培养的 MSCs 很快变成 SR 细胞并丢失其克隆形成能力和分化潜能 [Sekiya et al., 2002b; Gregory et al., 2005a, b]。在没有诱导培养基的情况下持续的汇合实际上可诱导自发的不可逆地向矿化细胞分化 [Gregory et al., 2004, 2005b]。人 MSCs 应当在 50%～60%汇合时传代，密度大约为 8×10^3 个细胞/cm^2（见图 9.3b）。大鼠 MSCs 生长的较快，应在密度未达到

50%时较早进行传代。

9.9　概要和评述

本章对成功准备、扩增和体外鉴定骨髓源MSCs的基本方案和原则进行了总结，根据这些步骤所得的MSCs具有异质性，含有一部分小的、纺锤体样的RS细胞和一部分较大的、更缓慢增殖的SR细胞。随着MSCs在培养过程中传代，RS细胞的比例下降，细胞的增殖和多向分化潜能降低。本章所描述的方案旨在，通过低密度培养和特异选择的组织培养基质，尽量保持MSCs的增殖能力和多向潜能。尽管SR细胞在分化测定时结果不理想，但是他们可以分泌重要的生长因子来支持培养体系。事实上，SR细胞似乎最有效的表达一些蛋白如Wnts，它是很多组织如造血干细胞的促有丝分裂原［Austin et al.，1997；Gregory et al.，2003］。所以，成功培养的MSCs很可能由RS和SR两种细胞组成，且绝大多数MSC为RS型。

9.10　材料来源

项　目	厂　商
抗生素溶液100×含10 000 U/ml青霉素G钠盐，10 000μg/ml链霉素硫酸盐，0.85%盐溶液配制	Invitrogen
抗坏血酸-2-磷酸	Sigma
自动吸量管	Drummond
B细胞标记CD79a，克隆IgG1 HM47和CD19，克隆IgG1 J4.119	Beckman Coulter
台式离心机	Eppendorf
骨形成蛋白（BMP）2和6	R&DSystems
CD105（即SH2或endoglin），克隆IgG3 IG2	Beckman Coulter
CD11b，克隆IgG1 Bear1	Beckman Coulter
CD14，克隆IgG2a RMO52	Beckman Coulter
CD19，克隆IgG1 J4.119	Beckman Coulter
CD34，内皮和造血标记，克隆IgG1 581	Beckman Coulter
CD45，白细胞标记，克隆IgG1 J.33	Beckman Coulter
CD73（即SH3或4），克隆IgG1 AD2	Becton Dickinson
CD90（即Thy1），克隆IgG1 Thy1/310	Beckman Coulter
细胞工厂	Nunc
CO_2培养箱，水套式	Forma Scientific
Cryo－1℃冰箱，5100-0001	Nalgene
真空瓶，2000	Cryosystem
地塞米松	Sigma
适用于杂交瘤的胎牛血清（FBS）且未经热灭活	Atlanta Biologicals or Hyclone
Ficoll-Paque	Amersham Pharmacia Biotech
0.22μm滤膜的滤器	Millipore
HLAⅡ类分子，克隆IgG2a TÜ36	BD Biosciences
胰岛素转铁蛋白硒混合物（ITS+）	BD Biosciences
倒置显微镜，Eclipse TS100	Nikon
液氮罐	Cryosystem

续表

项　目	厂　商
微生物安全柜Ⅱ A/B3 级	Forma scientific
微量离心机，5417C	Eppendorf
微量吸管操纵器	Eppendorf
单个核细胞/巨噬细胞标记 CD14，克隆 IgG2a RMO52 和 CD11b，克隆 IgG1 Bear1	Beckman Coulter
多孔培养板	Corning
培养皿	Corning 或 Nunc
吸管操纵器	Eppendorf
脯氨酸	Sigma
制冷台式离心机，5810R	Eppendorf
6 孔培养板	Corning
丙酮酸钠	Sigma
无菌滤器	Millipore
组织培养板，6 孔，孔面积 9.6cm^2	Corning
转化生长因子-β3（TGF-β3）	R&DSystems
胰蛋白酶/EDTA	Invitrogen
0.22μm^{2}滤膜的真空滤器	Millipore
水浴箱，Isotemp	Fisher scientific

（杨　卓　译）

参考文献

Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. (1997). A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* **89**:3624–35.

Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C. and Phinney, D. G. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J. Cell Biochem.* **89**:1235–1249.

Bang, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H., Lee, G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* **57**:874–882.

Bruder, S. P., Fink, D. J. and Caplan, A. I. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell Biochem.* **56**:283–94.

Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M. and D. J. Prockop (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7294–7299.

Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., Prockop, D. J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* **107**:275–281.

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. and Keiliss-Borok I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**:331–340.

Friedenstein, A.J., U. Gorskaja and N. N. Kalugina (1976). Fibroblast precursors in normal and

irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**:267–274.

Gregory C. A., Prockop, D. J. and Spees, J. L (2005a). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell Res.* **306**:330–335

Gregory, C. A, Ylostalo, J. and Prockop, D. J. (2005b). Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are pre-conditioned by micro-environmental "niches" in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci. STKE* **294**:pe37

Gregory, C. A., Perry A. S., Reyes, E., Conley, A. Gunn, W. G. and Prockop, D. J. (2005c). Dkk-1 derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* **280**,:2309–2323.

Gregory, C.A., Gunn, W. G., Piester, A. and Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red based method for the assay of mineralization by adherent cells in culture. Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **329**:77–84.

Gunn, W. G., Conley, A., Deininger, L., Olson, S. D., Prockop, D. J., Gregory, C. A. (2006). A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and IL-6: A potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells* **24**:986–991

Herrera, M. B., Bussolati, B., Bruno, S., Fonsato, V., Romanazzi, G. M., and Camussi, G. (2004). Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int. J. Mol. Med.* **14**:1035–1041.

Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E.. Pyeritz et al. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* **5**:309–313.

Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:8932–8937.

Javazon, E. H., Colter, D.C., Schwarz, E. J. and Prockop, D. J. (2001). Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* **19**:219–225.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002b). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**:41–49.

Jiang, Y., B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes and C. M. Verfaillie (2002a). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* **30**:896–904.

Jiang, Y., D. Henderson, M. Blackstad, A. Chen, R. F. Miller and C. M. Verfaillie (2003). Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100, Suppl 1**:11854–11856.

Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* **30**:896–904.

Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* **238**:265–272.

Katritsis, D. G., Sotiropoulou, P. A., Karvouni, E., Karabinos, I., Korovesis, S., Perez, S. A., Voridis, E. M. and Papamichail, M. (2005). Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal

stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc. Interv.* **65**:321–329.

Koc, O. N., Day, J., Nieder, M., Gerson, S. L., Lazarus, H. M. and Krivit, W. (2002). Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.* **30**:215–222.

Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. M., Deans, R., Marshak, D. R., and Flake, A. W. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* **6**:1282–1286.

Mangi, A. A., Noiseux, N., Kong, D., He, H., Rezvani, M., Ingwall, J.S., and Dzau, V.J. (2003). Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 9:1195–1201.

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5807–5812.

Ortiz, L. A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., and Phinney, D. G. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:8407–8411.

Peister A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F. and Prockop, D. J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* **103**:1662–1668.

Pereira, R. F., O'Hara, M. D., Laptev, A. V., Halford, K. W., Pollard, M. D., Class, R., Simon, D., Livezey, K., and Prockop, D. (1998). Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1142–1147.

Pereira, R.F., K. W. Halford, M. D. O'Hara, D. B. Leeper, B. P. Sokolov, M. D. Pollard, O. Bagasra and D. J. Prockop (1995). Cultures of adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:4857–4861.

Phinney, D. G., Kopen, G., Isaacson, R. L. and Prockop D. J. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: Variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell Biochem.* **72**:570–585.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143–147.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* **276**:711–74.

Reyes, M. and C. M. Verfaillie (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **938**:231–233.

Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Ichinose, S., Shinomiya, K. and Muneta, T. (2004). Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* **104**:2728–2735.

Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* **52**:2521–2529.

Sekiya I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J. G. and D. J. Prockop (2002b). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* **20**:530–541.

Sekiya, I., J. T. Vuoristo, B. L. Larson and D. J. Prockop (2002a). In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:4397–4402.

Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Reger, R. L., Prockop, D. J. (2005). Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* **320**:269–276.

Smith, J. R., Pochampally, R., Perry, A., Hsu, S. C., Prockop, D. J. (2004). Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* **22**:823–831.

Zuk P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* **13**:4279–4295.

第10章 软结缔组织干/祖细胞的分离、鉴定和培养

CHARLES W. ARCHER, SARAH OLDFIELD, SAMANTHA REDMAN, LAURA HAUGHTON, GARY DOWTHWAITE, ILYAS KHAN, and JIM RALPHS
Connective Tissue Biology Laboratories and Cardiff Institute of Tissue Engineering and Repair, Cardiff University, Museum Avenue, Cardiff CF 10 3US, Wales, UK. archer@cardiff. ac. uk

10.1 研究背景

本实验室一直集中于早期骨骼发育的研究，最近，我们的研究方向延伸至发育中的关节和关节软骨。我们不懈努力，希望在软骨发育至修复机制研究过程中所获得的知识得以应用。软骨具有较差的修复能力，部分原因是其无血管并且神经分布较少。因此，当软骨损伤，创伤未累及下层的软骨下骨时，因为缺少出血、炎症因子的渗出，不能发生正常的炎症性创伤反应。当累及软骨下骨时，损伤处发生出血，血凝块形成，这将通过骨髓基质组分，最终导致创伤修复（骨髓基质干细胞的详细资料见第9章）。缺少神经分布也对组织产生影响，这是因为若损伤只发生在软骨，患者可能对其忽视，很可能由于承重活动或接触运动长期使用损伤处，使病情恶化，导致将来或更重的组织损伤［见 Redman et al.，2005 综述］。

目前，对于关节软骨损伤有少数几种生物学治疗方法。一种为微小骨折处理，在软骨下板钻出小孔至下面的骨髓腔［Beiser and Kanat，1990］。此处理可使出血进入损伤处，有助于骨生成和间充质干细胞（MSCs）进入，利于纤维软骨样修复组织形成。其

次，骨膜移植应用于临床并得到了令人鼓舞的结果［Alfredson and Lorentzon，1999］。嵌合成形术（mosaicplasty）包括从关节周围部位取出软骨栓子，将其移植到软骨破坏或侵蚀的部位［Hangody et al.，2004］。最后，为自体软骨移植（ACI），损伤发生在承重部位时，从关节周围获得软骨，取出软骨细胞做单层细胞培养，再将这些细胞移植回损伤处，并且利用骨膜或胶原瓣固定位置［Brittberg，1999］。但是，由于细胞在允许的培养环境中经过一系列的细胞分裂，会丢失表型和重新表达这些标志的能力（通常群体倍增数约为 7），可处理的损伤面积有限。因此，可提供更大细胞来源的技术具有非常重要的价值。

目前，我们第一个分离和鉴定了未成熟牛关节软骨的祖细胞群体［Dowthwaite et al.，2004］，证明了其群体扩增倍数可以达到 50，通过持续表达调节软骨发生的重要转录因子 Sox-9 来维持其成软骨潜能［Lefebvre et al.，2001］。我们将细胞注射到处于发育过程中内源组织明显分化之前的鸡四肢，移植后 7 天即宿主组织已分化结束时，对其进行分析，进一步证明了这些细胞在结缔组织谱系范围内具有表型可塑性。我们发现关节软骨祖细胞已植入肢体所有类型的结缔组织。此外，我们使用了牛胶原特异的 I 型胶原抗体检测功能性移植，没有发现鸡胶原。我们还发现在荧光显微镜下肌腱内的胶原纤维呈平行排列，以及骨膜下骨发出微弱荧光，提示了这些细胞的功能性移植和存活。

我们进而提出问题，人软骨中是否存在祖细胞群体？如果存在，是在哪个年龄阶段？让人惊讶的是，基于下述标准，我们可以从老龄（>70 岁）关节软骨，骨关节炎软骨的细胞簇和胎儿软骨中鉴定出祖细胞样特性的细胞。

有趣的是，以潜在临床应用的观点来看待关节修复操作时，既然从多种其他结缔组织均可获得具有软骨生成潜能的细胞，组织来源的选择就成为了重要问题（可能由于只在近期从组织自身发现祖细胞）。这包括骨膜［O'Driscoll and Fitzsimmons，2001］、软骨膜［Arai et al.，2002］、骨髓基质细胞［Vaananen，2005］、脂肪组织［Guilak et al.，2004］和皮肤干细胞［Sorrell and Caplan，2004］，并将它们在动物损伤模型中进行了比较［Hui et al.，2005］。新近，脐静脉血也被证明包含成软骨潜能的细胞群体［Moise，2005］（见第 7 章）。就软骨而言，可能实际上从软骨组织获得的任何干细胞均可以被诱导获得成软骨潜能，但表型的强度和稳定性也许有所不同。所以，由干/祖细胞生成的软骨细胞无论来源相同还是不同，它们都不是完全相同的。

本章所描述的技术均基于对纤连蛋白的差异黏附。通常，许多干/祖细胞对纤连蛋白具有高亲和性，我们首次在关节软骨中分离这些细胞，也是部分基于软骨细胞表面纤连蛋白特别区域 A（EDA）剪接变体的特异表达［Dowthwaite et al.，2004］。不可否认地，至今我们还不知道这个剪接变体和祖细胞的关系。但是，我们感兴趣的是这些细胞在临床上的应用，而这是一个有用的分离方法，理由如下：如果我们基于细胞表面表达的分子来分离细胞，就需要荧光激活细胞分析术（FACS），但是，（至今）还没有这样的仪器胜任临床使用，并且看起来不可能在较短时间内可以实现。使用纯化配体虽然提供了较好的前景，但质量控制仍然存在问题。不过，未来通过应用重组分子，如包含 RGD 序列的分子（精氨酸-甘氨酸-门冬氨酸基序作为结合素受体的配体），可能会保证供临床应用这些细胞所需的高度纯化配体的有效性。综上所述，其他现有方法正在试图找出从软骨和其他类型结缔组织中分离的，具有成软骨潜能的单个克隆细胞系的预测

标记。

10.2 培养基和试剂准备

10.2.1 从人关节软骨中分离软骨祖细胞

10.2.1.1 消化培养基

(i) 链霉蛋白酶

DMEM/Ham's F-12 (1∶1) 中含有：

FBS ………… 5%

抗坏血酸 ………… 50μg/ml

葡萄糖 ………… 1mg/ml

庆大霉素 (50 mg/ml) ………… 0.2% (终浓度 100μg/ml)

链霉蛋白酶………… 70U/ml

HEPES ………… 10mmol/L

(ii) 胶原酶消化培养基

DMEM/Ham's F-12 (1∶1) 中含有：

FBS ………… 5%

抗坏血酸 ………… 50μg/ml

葡萄糖………… 1mg/ml

庆大霉素 (50 mg/ml) ………… 0.2% (终浓度 100μg/ml)

Ⅰ型胶原酶 ………… 300U/ml

HEPES ………… 10mmol/L

10.2.1.2 鉴别黏附测定培养基

DMEM/Ham's F-12 (1∶1) 中含有：

抗坏血酸 ………… 50μg/ml

葡萄糖………… 1mg/ml

庆大霉素 (50 mg/ml) ………… 0.2% (终浓度 100μg/ml)

10.2.1.3 生长培养基

DMEM/Ham's F-12 (1∶1) 中含有

FBS ………… 10%

抗坏血酸 ………… 50μg/ml

葡萄糖………… 1mg/ml

庆大霉素 (50 mg/ml) ………… 0.2% (终浓度 100μg/ml)

10.2.1.4 分化培养基

DMEM/Ham's F-12 (1∶1) 中含有

HEPES ………………………………………………………………………………… 10mmol/L
ITS（胰岛素、转铁蛋白、硒；见10.6节） ………………………………… 1%（V/V）
TGF-β1 ………………………………………………………………………………… 1ng/ml

10.2.2 从人滑膜中分离软骨祖细胞

10.2.2.1 高胶原酶消化培养基

DMEM中补充：
FBS ………………………………………………………………………………………… 5%
胶原酶……………………………………………………………………………… 1500U/ml
HEPES ………………………………………………………………………………… 10mmol/L
抗生素/抗真菌药物（10 000 U/ml青霉素，10 mg/ml链霉素，25μg/ml两性霉素B）1%（V/V；分别为100 U/ml，100μg/ml和0.25μg/ml，终浓度）
庆大霉素（50 mg/ml） ………………………… 0.2%（V/V；终浓度100μg/ml）

10.2.2.2 扩增培养基

DMEM中补充：
FBS ………………………………………………………………………………………… 20%
bFGF ………………………………………………………………………………… 5 ng/ml
TGF-β1 ……………………………………………………………………………… 2.5ng/ml
庆大霉素（50 mg/ml） ………………………… 0.2%（V/V；终浓度100μg/ml）

10.2.2.3 分化培养基

DMEM中补充：
ITS（胰岛素、转铁蛋白、硒；见章节10.6） ……………………… 1%（V/V）
TGF-β1 ……………………………………………………………………………… 15ng/ml
HEPES，1mol/L ………………………………………… 1%（终浓度10mmol/L）
庆大霉素（50 mg/ml） ………………………… 0.2%（V/V；终浓度100μg/ml）

10.2.2.4 磷酸盐缓冲液

（i）PBSC：含1mmol/L $CaCl_2$，1mmol/L $MgCl_2$的Dulbecco's磷酸盐缓冲液
（ii）PBSA：无Ca^{2+}，Mg^{2+}的Dulbecco's磷酸盐缓冲液

10.3 从正常人和骨关节炎患者的关节软骨中分离软骨祖细胞

此分离步骤包含称为差异黏附测定的实验（图10.1）。该测定基于细胞对于包被在petri培养皿上的特定细胞外配体的亲和性不同。关节软骨使用的配体为纤连蛋白。一部分培养板包被配体，对照板包被非黏附性配体，如牛血清白蛋白（BSA）。细胞在特定的短时间内以低密度接种至包被配体的平板，与配体有高亲和性的细胞最先贴壁，未

贴壁的细胞被吸出至第二个培养板。重复操作，未贴壁细胞被吸出，放入第三个培养皿，不再移动（图 10.2），将培养物持续培养，直到克隆可以分辨和分离。如果确定由单个细胞产生，则可以认为是克隆（图 10.3）。

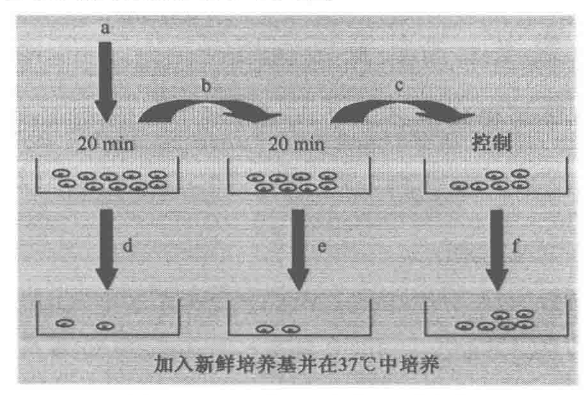


图 10.1　对纤连蛋白的差别黏附

分离的细胞（通常每 3.5cm 培养皿中 4000 个细胞）接种于纤连蛋白包被的培养皿上（10μg/ml）静置 20min（a），未贴壁细胞移入第二个纤连蛋白包被的培养皿中（b），孵育 20min 后，将未贴壁细胞移入到另一个纤连蛋白包被的培养皿（c）。每个步骤余下的细胞中加入培养基，在 37℃孵育使细胞初次贴壁，进而计算克隆形成。注意对于软骨细胞，集落（d 中灰色的）只会在前 20min 贴附于纤连蛋白的细胞中形成。

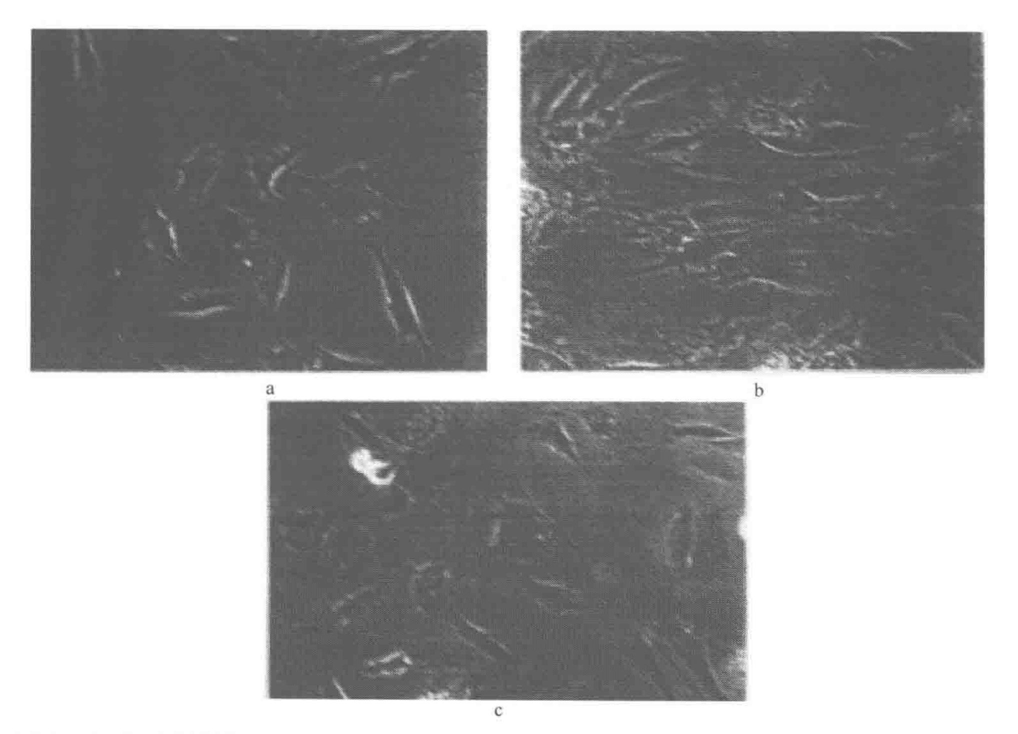


图 10.2　通过链霉蛋白酶和胶原酶依次消化得到的正常人软骨细胞，对纤连蛋白的差别黏附。选择大于 32 个细胞组成的集落（a）传代培养。图示传代早期（b，12 群体扩增倍数）和传代晚期（c，>30 群体扩增倍数）的细胞。

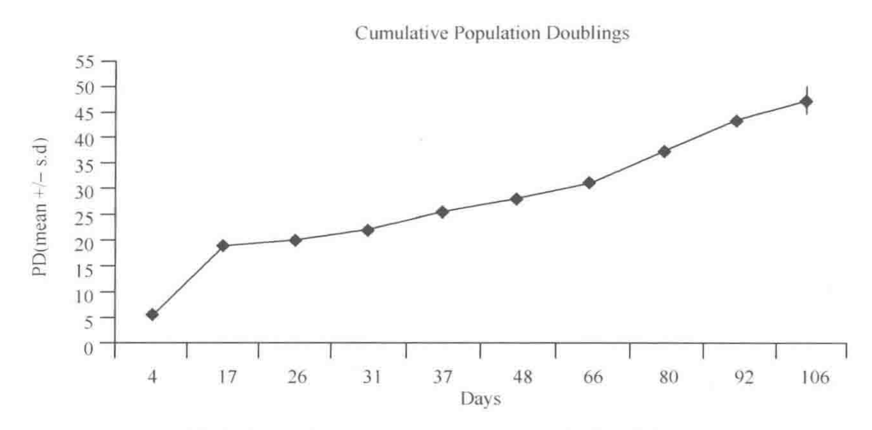


图 10.3 曲线图代表从 67 岁患者分离到的单个克隆细胞系的累积群体扩增倍数。

方案 10.1 从人关节软骨中分离软骨祖细胞

试剂和材料

灭菌或无菌准备

□ 除颞下颌和锁骨关节，其他任何滑膜关节的关节软骨均为纤维软骨。所处年龄范围很宽，我们曾从 83 岁的患者软骨中获得了克隆群体。目前，正常软骨很难获得，我们经常使用骨关节炎患者行膝盖关节半切开术时未累及的部分。

由于骨关节炎行半关节切开术时，可得到患者膝盖未发生病变的部分，尽管软骨从患病的关节获得，通常肉眼及组织学示未累及的髁是正常的。

□ 链霉蛋白酶消化培养基（见 10.2.1.1 节）

□ 胶原酶消化培养基（见 10.2.1.1 节）

□ 胰蛋白酶/EDTA：胰蛋白酶（0.05%）和 EDTA（0.53mmol/L）PBSA 配制

□ PBSC（见 10.2.2.4 节）

□ PBSA（见 10.2.2.4 节）

□ 胎牛血清

□ 牛血清白蛋白（BSA），10μg/ml 和 1mg/ml，PBSC 配制

□ 血清纤连蛋白，10μg/ml，PBSC 配制

□ 尼龙膜，40μm 筛孔（“细胞滤网”）

□ 普通器皿，30ml，或离心管 50ml，带圆锥底部便于细胞离心

□ 解剖刀片，10 号

□ 解剖刀柄，3 号

□ 镊子，2 对（1 大 1 小）

□ 矿油凝胶（凡士林）

□ 克隆环，6mm

未灭菌

☐ 标准台式离心机

☐ 微量离心机

☐ 分离软骨用的锁子甲手套

☐ 记号笔

步骤

A. 组织收集和细胞分离

(a) 无菌条件下，用10号解剖刀片小心从软骨下骨下面解剖软骨（见本方案后的注解1）。将软骨薄片置于含PBSA的9cm Petri培养皿中。

(b) 用镊子和刀片仔细将软骨切成$1mm^3$小块。

(c) 将软骨小块转移至含18ml链霉蛋白酶消化培养基的普通器皿或离心管中。

(d) 置于滚转机37℃处理1h。

(e) 吸出消化液弃之。

(f) 加入18ml胶原酶消化培养基，再次置于滚转机37℃处理1h。

(g) 40μm细胞滤网过滤。

(h) 用血细胞计数板进行细胞计数。

(i) 加入黏附测定培养基，620g离心10min进行洗涤，用黏附培养基以2000个细胞/ml密度重悬细胞（4000个细胞）。

B. 差异黏附测定（见图10.1）

(a) 用10μg/ml纤连蛋白包被3.5cm Petri培养皿，4℃过夜。阴性对照使用10μg/ml BSA。

(b) 吸出液体，用含1mg/ml BSA的PBSC封闭培养皿30min。

(c) 加入2ml培养基重悬的细胞悬液静置20min。

(d) 吸出培养基和未贴壁细胞，置于第二个培养皿中20min。

(e) 向第一个培养皿中加入2ml生长培养基后置于孵箱。

(f) 从第二个培养皿中吸出培养基和未贴壁细胞至第三个培养皿中。

(g) 向第二个培养皿中加入2ml生长培养基后置于孵箱。

(h) 向最后一个培养皿中加入200μl FBS后置于孵箱。

(i) 3h后，用相差显微镜计数最初贴壁的细胞。

(j) 培养细胞，至明显可见多于32个细胞的集落（见注解2），一般需10天。

(k) 用以下公式计算集落形成率（CFE）：

$$CFE = \frac{x\text{ 天的集落数}}{0\text{ 天贴壁细胞数}}$$

集落扩增

(a) 用相差显微镜鉴定多于32个细胞的细胞集落，在培养皿下用记号笔将其画圈标记（见注解3）。

(b) 计数和记录每个集落的细胞数量（见注解4）。

(c) 从 Petri 培养皿中吸出培养基，用 PBSA 润洗。

(d) 在克隆环上无菌涂抹凡士林，或者使用无菌镊子直接将其浸入凡士林。

(e) 将克隆环置于集落上（见注解 5），向圈中加入胰蛋白酶/EDTA 溶液，静置 5～10min——相差显微镜观察细胞已脱离。

(f) 重悬细胞，置于 Eppendorf 管中，300g 离心 5min（见注解 6）。

(g) 生长培养基洗涤，重复上述离心。

(h) 生长培养基稀释，12 孔板中每孔接种 1 个集落。

(i) 细胞汇合时，接种至 3.5cm 培养皿（或 6 孔板），然后再移至较大培养瓶，如 25cm^2，75 cm^{2}最后为 175 cm^2。

注解

(1) 解剖小块软骨或单个髁状突时，解剖过程中用大镊子抓牢将其固定。如果解剖整个骨骼，戴好锁子甲手套（乙醇清洗）以固定关节。软骨很滑，并且髁状突呈弯曲状，很容易割伤自己！表面滴加灭菌 PBSA 可保持软骨湿润。

(2) 选择大于 32 个细胞的集落，需注意避免选择可形成过渡放大群的细胞（祖细胞的直接后代），它们正常可扩增 5 个群体细胞倍数（PDs）。

(3) 可以通过实验员观察和借助显微镜等一系列方法标记集落，例如，通过物镜放大后进行标记。有些人直接将克隆环放在集落上，在层流通风橱中使用解剖镜。标记圈应适合倒置显微镜的物镜转换盘，可从 Nikon 获得。

(4) 如果需要精确判定细胞所经过的集落扩增倍数，计数每个集落中的细胞尤为重要。

(5) 确保要标记的集落间有足够的空间以避免污染；或者，可能的话将克隆环缩小。

(6) 如果使用较小的克隆（35～50 个细胞），Eppendorf 洗涤的步骤可以省略，将带有胰蛋白酶/EDTA 的细胞直接转移到 12 孔板中，所含的 2ml 生长培养基足够中和胰蛋白酶。

(7) 软骨的细胞外基质均随年龄增多。所以，消化时间随着供者的年龄有所变化，年轻供者的组织较短的时间即可完全消化。应切记尽量缩短使细胞脱落的消化时间以保证最大的细胞存活率。在胶原酶中以小时间隔进行急剧搅拌可加速组织溶解过程。作为指导，每克软骨中至少加 7ml 消化液，超过此体积无妨但浪费试剂。如果是年龄很小的供者，参考以下的胎儿软骨操作步骤。

(8) 克隆细胞系转移至 6 孔板或 3.5cm petri 培养皿，生长良好时，几天内可汇合，按 1∶2 稀释度传代。更大比例的稀释（1∶4 或 1∶8）可应用于更成熟的培养物。

(9) 使用胶原酶时单位活性很重要，因为不同批次间可相差 3 倍。建议做批次试验。

10.4　从人胎儿软骨中分离软骨祖细胞

此技术是上述方法的变本，但要注意组织处于未成熟状态，在发育过程中会大量消融，且只能轻微承重，含有较少的交联基质。

组织来源：我们通常使用9～12周妊娠期胎儿的发育中的四肢骨骼的软骨。在解剖镜下用尖锐的灭菌镊子将软组织去除，在上半部分骨骺移入新的Petri培养皿前，将软骨牙基置于含PBSA的Petri培养皿中，仔细用刀片切碎。

方法与成体组织基本相同，但有时组织只在胶原酶中1h即完全消化。可选择的措施是，将链霉蛋白酶和胶原酶的浓度降低为1/3（例如23U/ml链霉蛋白酶和100U/ml胶原酶），然后按成体软骨的正常时间消化。

10.4.1 祖细胞标志

如同其他很多组织，目前在关节软骨中还没有单一的祖细胞标记。取而代之的是，我们依赖一些膜结合标记的组合，包括CD105（内皮糖蛋白），CD157（BST1），CD166（ALCAM），Stro-1和Notch-1。

10.4.2 分化

要使这些祖细胞分化为软骨细胞，必须将其移到允许细胞聚集成圆形结构的培养条件下，因为这样可促进软骨生成。如上所述，细胞形状和包括肌动蛋白细胞骨架状态的软骨生成之间存在一种整体的关系［Benya et al.，1988］。

方案10.2 人软骨祖细胞的分化

试剂与材料

灭菌

- ☐ 分化培养基（见10.2.1.4节）
- ☐ PBSA（见10.2.2.4节）
- ☐ 胰蛋白酶/EDTA：胰蛋白酶（0.05%）和EDTA（0.53mmol/L）PBSA配制
- ☐ 离心管，15ml
- ☐ 普通器皿（30ml）或圆锥底的离心管（50ml）

未灭菌

- ☐ 血细胞计数板
- ☐ 微量离心器

步骤

(a) 从培养瓶中吸出生长培养基弃之。
(b) PBSA润洗后弃去洗液。
(c) 加入足量的胰蛋白酶/EDTA覆盖培养瓶底。
(d) 在37℃孵育5～10min（在显微镜下观察细胞是否脱落）
(e) 重悬细胞，置于15ml离心管中，300*g*离心5min。
(f) 用1ml生长培养基洗涤，转移至普通器皿或离心管中。

(g) 用血细胞计数板对细胞进行计数。

(h) 重复离心 (620g, 10min), 弃去上清液。

(i) 用分化培养基将其稀释到 1×10^6 个细胞/ml。

(j) 按 1ml/管分装到新 Eppendorf 管中。

(k) 300g 离心 5min, 上清保留不动。

(l) 置于 37℃孵箱。

(m) 每 2～3 天更换培养基 (见下面的注解 1)

(n) 培养 2～3 周软骨生成 (见注解 2)

注解

(1) 前几次更换培养基要格外小心，因为只有少量基质将沉淀聚集在一起，操作时很容易分散沉淀。

(2) 虽然我们在这里集中阐述的软骨生成，但适当的培养基也可用来诱导其他表型。无论沉积培养还是单层细胞培养，我们都成功地使牛软骨祖细胞获得了成骨、成脂肪和成神经的表型。

10.5 从人滑膜中分离祖细胞

滑膜围绕着关节腔，包含滑膜液。滑膜的功能之一是包含和产生滑膜液组分，如透明质烷和润滑素。滑膜分两层。外部的内膜下层几乎可以是任何组织：纤维、脂肪或者疏松的“细隙”。内膜层细胞有两种类型：成纤维细胞和巨噬细胞，它们在某些方面与其他组织中的同类细胞有所不同。

此步骤使用差异黏附测定的简化形式选择干/祖细胞。

方案 10.3 人滑膜软骨祖细胞的分离、培养和分化

灭菌或无菌准备

□ 组织来源：骨关节炎患者全关节置换得到的胫骨滑膜；需要正常组织时使用新鲜的尸体组织。

□ DMEM (包含 4.5g/L 葡萄糖和 4mmol/L L-谷氨酰胺)

□ 高胶原酶消化培养基 (见 10.2.2.1 节)

□ 黏附培养基：含 100 μg/ml 庆大霉素的 DMEM

□ 克隆生长培养基：DMEM，10% FBS 和 100 μg/ml 庆大霉素

□ 扩增培养基 (见 10.2.2.2 节)

□ 分化培养基 (见 10.2.2.3 节)

□ PBSC (见 10.2.2.4 节)

□ 胎牛血清

□ 牛血清白蛋白 (BSA)，用 PBSC 配成 10μg/ml

☐ 血清纤连蛋白，1mg/ml
☐ Nitex 细胞滤网 40μm 筛孔
☐ 解剖刀片，10 号和 23 号
☐ 解剖刀柄，3 号和 4 号
☐ 镊子，2 对
☐ 普通器皿，30ml，或离心管 50ml
☐ 矿油凝胶（凡士林）
☐ 克隆环，6mm

未灭菌
☐ 从关节周围取下滑膜时起保护作用的锁子甲手套

步骤

A. 组织收集和细胞分离

(a) 在无菌条件下，小心从关节周围剪下滑膜，戴好锁子甲手套的手固定平顶。

(b) 将滑膜移至含 PBSC 的 Petri 培养皿中，在解剖镜下用镊子取出脂肪组织（见注释 1）。

(c) 将清洁后的滑膜移至新的含 PBSC 的 Petri 培养皿中（见注释 2）。

(d) 用刀片和镊子分离组织，与 10ml 消化培养基一起移至普通器皿（见注释 3）。置于滚转机上 37℃过夜。

(e) 加入黏附培养基，300*g* 离心 10min 洗涤细胞 2 次。用黏附培养基重悬，2ml 中含 4000 个细胞。

(f) 40μm Nitex 细胞滤网过滤。

B. 差别黏附测定（见图 10.1）

(a) 用纤连蛋白包被 3.5cm Petri 培养皿（或 12 孔板），4℃过夜。阴性对照使用 10μg/ml BSA。

(b) 滴加 2ml 细胞悬液至包被的培养皿，于 5% CO_2 孵箱中静置 20min。

(c) 吸出未贴壁细胞，弃之。

(d) 加 2ml 生长培养基培养 10 天，于在第 5 天更换新的培养基。

C. 克隆和细胞扩增（见注解 5）

(a) 集落（>32 细胞）生成同软骨祖细胞（见方案 10.1C）

(b) 按 1 个克隆/孔将细胞移至 12 孔板，加入含 bFGF 和 TGF-β1 的扩增培养基。

(c) 继续扩增细胞，按方案 10.1 种步骤 C 示，将细胞从 12 孔板移至 6 孔板，再到 $25cm^2$，最后到 $75cm^2$ 培养瓶中。

D. 分化

诱导分化的步骤基本与上述软骨祖细胞相同（见方案 10.2）。但是，需注意培养基

不同（见 10.2.2.3 节）。我们的试验体系中，14 天时基质中出现Ⅱ型胶原的未成熟形式（Ⅱa）。成熟胶原（Ⅱb 型）的表达需要较长的培养时间。

注解

（1）若组织中有很多黏附的脂肪，使用 23 号刀片和 3 号刀柄较容易操作。

（2）Hank's 平衡盐溶液（HBSS）可以取代 PBSC。

（3）较大的组织量可以用 50ml 管和 30ml 消化培养基。

（4）若使用培养皿做差异黏附测定，观察克隆时，用记号笔在培养皿盖子上打点对克隆进行标记，观察克隆时据此定位。然后与第二个标记的克隆进行对比。或者，使用 Nikon 标记环。

（5）若克隆细胞系扩增缓慢，向培养基中加入 5ng/ml PDGF 也许有所帮助。

10.6　材料来源

项　目	货　号	厂　商
抗坏血酸	A4034	Sigma Aldrich
抗生素/抗真菌药物	15240-062	Invitrogen
bFGF	F0291	Sigma Aldrich
BSA	A3059	Sigma Aldrich
细胞滤器，40μm	352340	BD Biosciences
离心管，50ml	430828	Corning
锁子甲手套		BRB Industrial Services
克隆环	C7983	Sigma Aldrich
胶原酶，Ⅰ型	C0130	Sigma Aldrich
DMEM	41965-062	Invitrogen
DMEM/Ham's F-12	21331-046	Invitrogen
培养皿，3.5cm	430165	Corning
胎牛血清（FBS）	10106-169	Invitrogen
纤连蛋白	F1141	Sigma Aldrich
过滤，40μm（见细胞滤器）		
培养瓶，25 cm^2	3056	Corning
培养瓶，75cm^2	3376	Corning
培养瓶，175 cm^2	431079	Corning
庆大霉素	15750-045	Invitrogen
葡萄糖	G6152	Sigma Aldrich
HEPES	15630-056	Invitrogen
ITS	41400-045	Invitrogen
磷酸盐缓冲液，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}（PBSA）	P4417	Sigma Aldrich
培养板，6 孔	3516	Corning
培养板，12 孔	3513	Corning
链霉蛋白酶	1459643	Roche
TGF-β1	100B	R&DSystems
胰蛋白酶/EDTA	25300-062	Invitrogen
普通容器，30ml	128B	Sterilin

（杨　卓　译）

参考文献

Alfredson, H. and Lorentzon, R. (1999). Superior results with continuous passive motion compared to active motion after periosteal transplantation. A retrospective study of human patella cartilage defect treatment. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **7**:232–238.

Arai, F., Ohneda, O., Miyamoto, T., Zhang, X. Q. and Suda, T. (2002). Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J. Exp. Med.* 195:1549–1563.

Beiser I.H. and Kanat, I. O. (1990). Subchondral bone drilling: a treatment for cartilage defects. *J. Foot Surg.* **29**:595–601.

Benya, P. D., Brown, P. D. and Padilla, S. R. (1988). Microfilament modification by dihydro-cytochalasin B causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J. Cell Biol.* **106**:161–70.

Brittberg M. (1999). Autologous chondrocyte transplantation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **367 Suppl**:S147–S55.

Dowthwaite, G.P., Bishop, J. C., Redman, S., Rooney, P., Bayram, Z., Evans, D., Boyer, S., Thomson, B. and Archer, C. W. (2004). The surface zone of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J. Cell Sci.* **117**:889–897.

Guilak, F., Awad, H. A., Fermor, B., Leddy, H. A. and Gimble, J. M. (2004). Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* **41**:389–399.

Hangody, L., Rathonyi, G.K., Duska, Z., Vasarhelyi, G., Fules, P. and Modis, L. (2004). Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J. Bone Joint Surg. Am.* **86-A, Suppl 1**:65–72.

Hui, J. H., Li, L., Ouyang, H. W. and Lee, E. H. (2005). Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng.* **11**:904–12.

Lefebvre, V., Behringer, R., de Crombrugghe, B. (2001). Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* **9, Suppl A**:S69–S75.

Moise, K.J. (2005). Umbilical cord stem cells. *Obstet. Gynecol.* **106**:1393–1407.

Redman, S., Oldfield, S. and Archer, C. W. (2005). Cartilage repair—A review. *Eur. Cells Mater.* **9**:23–32.

O'Driscoll, S. and Fitzsimmons, J. (2001). The role of periosteum in cartilage repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **391S**:S190–S207.

Sorrel, J. M. and Caplan, A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* **117**:667–675.

Vaananen, H. K. (2005). Mesenchymal stem cells. *Ann. Med.* **37**:469–479.

第11章　人角膜干细胞的培养

YIQIN DU and JAMES L. FUNDERBURGH
Department of Ophthalmology，UPMC Eye Center，University of Pittsburgh School of Medicine，Pittsburgh，PA 15213. Corresponding author：jlfunder@pitt.edu

11.1 概述

11.1.1 章节目标

角膜是一个相对简单的器官，由三种不同的组织层组成。其中一层是能够自我更新的上皮层，该层长期以来被认为包含有固有的干细胞群。另外两层角膜组织在婴儿期后基本上是静止的，直到最近人们仍然认为它们没有自我更新能力或包含有干细胞。在近十年中，上述观点有所改变。角膜上皮干细胞的定位及特性已经被多个研究组阐释清楚，现已能够将这一干细胞群体大量扩增并应用于临床治疗。此外，已从角膜基质和角膜内皮中分离和鉴定出了具备成体干细胞特性的细胞群体。本章节讲述了鉴定、分离、培养上述三群细胞的方法，并对这些细胞的干细胞特性及用于临床治疗和在组织工程方面的应用的潜能进行了综述。

11.1.2 角膜的结构和细胞组成

角膜是视觉系统的窗户。作为眼睛的最外层，角膜同时具有屏障作用及传导光线至视网膜的重要视光学功能。除传导光线外，角膜提供了使光线在视网膜聚焦成像所需要的 70%～75%的屈光力［Zieske，2004］。角膜由三种特异分化的细胞组成，这三种细胞间有基膜相隔（图 11.1）。最外层由非角化的复层鳞状上皮组成。这层组织依附的基底膜附着于无细胞的结缔组织 Bowman 层。角膜总体的 90%是由胶原所组成的角膜基质。基质中含有角膜细胞，角膜细胞是来源于神经嵴的间质细胞，能够分泌构成角膜基质特有的透明组织。角膜的内侧是内皮细胞层，由单层扁平立方细胞构成，这层细胞通

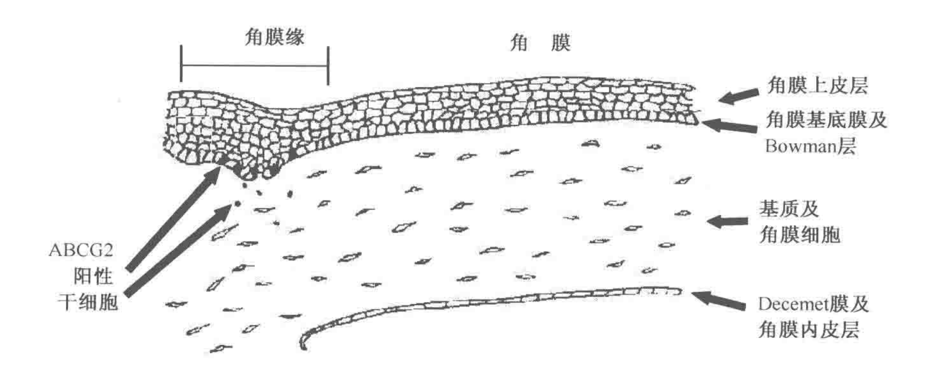


图 11.1　角膜切面示意图

过调节角膜的含水量来维持角膜的透光性。角膜基质和角膜内皮层之间是后弹性层，或称为德斯密膜（Descemet membrane）。

人角膜大约开始形成于妊娠的 5～6 周［Zinn and Mockel-Pohl，1975］。在晶状体泡从表面外胚层分离出来后，后者形成一层立方形的上皮细胞，并且最终构成角膜上皮层。神经嵴细胞移行于角膜上皮与晶状体之间，形成了角膜内皮层。第二批来自神经嵴的移行细胞发育成基质层［Johnston et al.，1979；Wulle，1972］。

这三个细胞层在有丝分裂及自我更新能力上都存在着显著的差异。在角膜上皮层中，分裂活跃的基底层细胞不断更新着不分裂的上部基底层细胞群，后者在向角膜表面不断移行过程中逐渐变平，并随脱屑最终脱落。另一方面，成年人的角膜基质细胞很少发生分裂，他们在胚胎形成晚期细胞定域后快速分裂，但在出生后，他们便很少或几乎不发生分裂。而在炎症或者外伤的情况下，角膜基质细胞会被重新激活进行分裂，活化细胞的表型类似于成纤维细胞和肌成纤维细胞，由这些细胞分泌的结缔组织在修复过程中形成不透明的瘢痕。修复之后，细胞再次进入休眠状态，但人类角膜瘢痕消退得非常慢，并且不清楚该处的细胞是否会恢复成完全的角膜细胞表型。这些性质说明角膜基质层的自我更新能力十分有限。

角膜内皮层细胞的自我更新能力比角膜细胞更加有限。儿童期后，人类的角膜内皮细胞便不再分裂。角膜内皮细胞损伤后，其损伤区由邻近的内皮细胞增大扩展和移行来覆盖。在体外，人类角膜内皮细胞自婴儿期后仅显现出很有限的分裂能力［Engelmann et al.，1988，2004；Ide et al.，2006；Joyce，2003；Joyce and Zhu，2004；Konomi et al.，2005；Sumide et al.，2006；Wilson et al.，1995；Yokoo et al.，2005；Zhu and Joyce，2004］。

这些特性使得传统观点认为角膜上皮细胞可以通过角膜干细胞群来维持，而角膜内皮细胞和基质的细胞只有非常有限的自我更新能力因而并不是组织固有的干细胞群更新的产物。

11.1.3　角膜干细胞存在的证据

干细胞被定义为能够进行不对称分裂的细胞，即在进行自我更新时会产生分化的子代细胞。源于胚泡内细胞团的胚胎干细胞具有多能性，可以分化成人体绝大多数种类的细胞。体外培养的胚胎干细胞可以保持未分化状态。以往，人们认为具有自我更新能力的组织诸如真皮是由只能分化成单一细胞类型的组织内固有的干细胞发展而成。角膜上皮就是这样的组织，能快速再生的复层鳞状结构覆盖于角膜的最外面。在角膜中心由 5 层角膜上皮细胞构成，在角膜和结膜的交界处即角膜缘大约由 10～11 层构成（图 11.1）。称之为角膜缘 Vogt 栅栏区的解剖结构显示它是角膜上皮细胞的生发区［Davanger and Evensen，1971；Goldberg and Bron，1982］，但是能够自我更新的祖细胞的具体位置却一直不能确定，直到 Schermer 及其同伴［Schermer et al.，1986］发现角膜上皮干细胞存在于角膜缘基底细胞中。这一位置是通过分析角膜特异的角蛋白（K3）的表达来确定的，因为其在角膜缘基底部的一小群上皮细胞中表达是缺如的。损伤或者疾病破坏角膜缘基底细胞时会导致角膜上皮细胞丢失并且由结膜上皮细胞取代，致使角膜透明度下降。目前最好的干细胞标记是长期滞留的 DNA 标记物［^{3}H］脱氧胸苷或者

溴脱氧尿苷。利用这一标记物的特性可以通过“短暂增殖”的子代细胞将慢周期的干细胞群与快周期的细胞群加以区分，而这些干细胞就主要定位于角膜缘。虽然已经能够证实角膜缘干细胞的存在，但是目前还没有方法分离培养出纯的这类细胞群体。含有角膜缘干细胞的角膜缘移植片植入角膜干细胞缺乏的动物模型以及临床患者时，可以起到恢复角膜上皮功能的作用。绝大多数取自患者对侧眼的移植片都可以发挥功能，而同种异体移植片如果没有持续的抗排斥辅助治疗通常是会失败的［Espana et al.，2004］。

在过去的十年中，研究证实成人组织内的干细胞并不仅限于自我更新的上皮细胞或者是造血组织。具有干细胞性质的细胞即具有多系分化潜能和长生命周期的细胞，已经从多种成体间充质组织中分离出来［Verfaillie，2002］。角膜基质层是间充质结缔组织，它构成了角膜的主体部分，占角膜厚度的90%，具有维持角膜自身特征的物理性质。在发育过程中，角膜基质是由间充质神经嵴细胞分化形成的角膜细胞所合成和分泌的胞外基质：由Ⅰ、Ⅴ、Ⅵ型胶原蛋白和蛋白聚糖共同构成［Funderburgh，2000；Funderburgh et al.，1986；Hart，1976；Hay et al.，1979；Linsenmayer et al.，1986，1998］。在成熟过程中，基质层不断脱水，变薄和透明，并含有扁平且互联的角膜细胞［Jester et al.，1994］。在鸡胚形成的晚期，当鸡角膜细胞随着颅神经嵴的移行通路移植入新环境后，其依旧保持着神经嵴祖细胞的特征［Lwigale et al.，2005］。但在成年哺乳动物中，许多体外实验表明角膜细胞在几次分裂之后会很快失去特征性表型。在活体动物的创伤修复过程中，同样会失去特征性表型。最近，笔者发现牛的和人的角膜基质中含有一小部分具有自我更新能力的细胞，可以在体外成倍扩增［Du et al.，2005；Funderburgh et al.，2005］。这些角膜基质祖细胞具有分化为多种非角膜组织细胞的潜能［Duet al.，2005］，这一特性类似于成体的其他间充质干细胞。这些角膜间质干细胞可以在体外生成克隆并倍增100次以上。但目前，角膜间质干细胞的特性，尤其是伤口修复中的机制，依旧不清楚。有些学者认为角膜基质层中含有来源于骨髓的CD34阳性干细胞［Sosnova et al.，2005］。Nakamura等［2005］发现经致死量照射的小鼠，可以通过经由尾静脉注射表达绿色荧光蛋白（GFP）小鼠的骨髓细胞进行治疗，在受体小鼠角膜内可见定植的绿色荧光细胞群。但这种骨髓源性干细胞在角膜中的功能以及骨髓源细胞与角膜细胞间的关系仍不清楚。

角膜内皮是由单层扁平六边形细胞构成，介于角膜基质层和前房之间，以泵的功能调节基质的水合作用。角膜内皮层可以通过局部的紧密连接形成的可漏出的屏障使得房水中的营养物质进入无血管的角膜，并通过Na^+/K^+-ATP泵和碳酸盐依赖的离子泵将水和CO_2泵出基质层。该泵蛋白主要存在于外侧的质膜中［Joyce，2003］。虽然角膜内皮细胞同样也起源于神经嵴细胞，但它的特性却有别于角膜细胞。人类角膜内皮细胞是停滞于G_1期的单层多边形细胞，并不通过分裂增殖来取代死亡以及损伤的细胞［Joyce et al.，1996a，b］。由于相对缺乏分裂能力，导致角膜细胞大约以每年0.3%～0.5%的比例丢失［Bourne and Kaufman，1976；Hollingsworth et al，2001］。但零星的证据表明角膜内皮细胞内存在着有丝分裂的潜能。角膜内皮显微镜在发生排斥反应的角膜移植片中可见到有丝分裂像［Laing et al.，1984］。可见个体小于周围细胞的细胞簇，至少说明在某些条件下成人角膜内皮细胞会发生有丝分裂。最近Yokoo等［2005］证实角膜内皮细胞在黏附—非依赖培养（attachment-independent culture）中能够形成细

胞球。这些细胞球的形成条件类似于分离神经干细胞的条件，这些细胞可以增殖并产生表达神经和间充质的分子标记的子细胞。这些性质说明源于干细胞的细胞形成了这些细胞球。那些形成细胞球的细胞同样具有角膜内皮细胞的多边形形态特征，说明它们就是角膜内皮细胞的祖细胞。Mimura 等［2005b，c］证实这些细胞在角膜内皮细胞缺乏的动物模型体内的确具有恢复角膜内皮细胞功能的作用，研究小组［Mimura et al.，2005a］发现兔角膜上皮的周边和中央都有大量的前体细胞，但周边部角膜内皮含有更多的此类细胞，而且通过细胞球—形成分析法（sphare-forming assay）发现周边的前体细胞的自我更新能力也强于中心部。由于人体角膜内皮细胞还不能被长期培养，加之缺少干细胞和角膜内皮细胞的标记，所以还不能在原位鉴定设想中的角膜干细胞。

11.1.4　角膜干细胞的识别

尽管普遍认为角膜上皮干细胞存在于角膜缘，但由于缺乏独特的分子标志，识别这一细胞群体仍很困难。^{3}H 标记滞留在实验动物中最常用于识别干细胞，但这并不适用于人体。和肿瘤抑制因子 p53 是同系物的转录因子 p63 蛋白可以作为候选的分子标记，它高表达于多种上皮组织的基底部和生发层，对再生性增生非常重要［Yang et al.，1999］。但 p63 是否能够作为角膜缘干细胞的标志仍有争议。Pellegrini 等［1999，2001］的研究认为 p63 是角质干细胞的特异标志，因为它定位于基底部的角膜缘细胞中的一个亚群并且克隆分析显示高表达 p63 的克隆具有更高的克隆形成潜能。而 Wang 等［2003］则认为 p63 并不是干细胞特异性的标志，因为 p63 与 Ki-67（一种增殖细胞的标志）共表达于兔角膜缘切片的上基底部的细胞核中及外植于羊膜上的角膜缘上。Moore 等［2002］和 Joseph 等［2004］研究表明 p63 表达于小鼠和兔的角膜上皮移植物以及人的角膜缘移植，两项研究都分别显示了 p63 并不局限于干细胞，p63 持续表达于从培养的移植物中迁出的细胞并且在角膜的中心也有表达。基于 connexin-43（CX43 角膜缘干细胞的阴性标志）与 p63 共表达于培养 2～3 周形成的单层人角膜缘细胞的现象，Du 等［2003］得出结论，认为 p63 是干细胞的标志和角膜缘培养中的短暂增殖（TA）细胞的标志。Chert 等［2004］认为 p63 差异表达于人角膜缘的基底部细胞，因而是鉴定干细胞表型的几个标志之一。这一结论带来了 p63 是否能够作为角膜上皮干细胞标志的争论。最近，Salehi-Had 等［2005］认为培养过程中表达的 p63 不能用作干细胞的标志，因为他观察到集落中大多数表达 p63 的角膜上皮细胞来自于单一细胞，而且亚汇合培养忽略了培养的代次或细胞的连续分裂。角蛋白 3 和 12（K3 and K12）被广泛应用于鉴定已经分化的角膜上皮细胞，connexin-43（CX43）表达于基底部的上皮细胞（TA）而基底部的角膜缘（干）细胞不表达。因此上述抗原被看作是鉴定已分化的上皮细胞的标志［Grueterich et al.，2002；Schermer et al.，1986；Tseng，1989］。

最新的研究提示了一个更好的用于标记角膜上皮干细胞的候选标志分子，即抗药转运蛋白 ABCG2。具有泵出荧光染料 Hoechst 33342 的能力的成体干细胞，在流式荧光分选（FACS）时细胞的红色和蓝色荧光减低［Goodell et al.，1996］。这些细胞叫做“边群”（side population，SP）细胞，是因为在红和蓝双荧光坐标平面中这些 Hoechst 染色减弱的细胞像小尾巴一样位于大团活的体细胞的左下方。从多种成体组织中分离出

的 SP 细胞表现出许多干细胞的特性。用维拉帕米（verapamil）处理后，SP 细胞会消失，因为维拉帕米这种药物能够阻断 ATP 结合转运载体 G（the ATP-binding cassette transporter G）家族成员 ABCG2 的活性。研究认为这种蛋白转运载体是 Hoechst 的流出泵 [Kim et al.，2002；Scharenberg et al.，2002；Zhou et al.，2001] 同时也是多种干细胞的特异标志，诸如造血干细胞、间充质干细胞、肌肉干细胞 [Zhou et al.，2001]、神经干细胞 [Cai et al.，2004；Jang et al.，2004]、心脏干细胞 [Martin et al.，2004]、胰岛干细胞 [Lechner et al.，2002]、角质形成细胞干细胞 [Terunuma et al.，2003；Triel et al.，2004] 等。最近的研究显示，边群细胞存在于角膜上皮和间质组织。这些细胞表达 ABCG2 蛋白和 mRNA，与 SP 表型具有密切关系并具有干细胞特性 [Budak et al.，2005；de Paiva et al.，2005；Schlotzer-Schrehardt and Kruse，2005；Watanabe et al.，2004]。角膜的 ABCG2 阳性细胞位于角膜缘处（图 11.1）。上皮细胞中的这些细胞位于 Vogt 栅栏组织的隐窝中 [Dua et al.，2005]。间质中的 ABCG2 阳性细胞位于角膜缘基底膜的后面 [Du et al.，2005]

11.2 培养基和试剂的配制

11.2.1 PBSA/GASP

含抗生素的 PBSA：庆大霉素，50 μg/ml；两性霉素 B，1.25 μg/ml；链霉素，100 μg /ml；青霉素，100 U/ml (GASP)

11.2.2 CMF-Saline G

(i) NaCl …… 8 g/L
(ii) KCl …… 0.4 g/L
(iii) $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ …… 0.29 g/L
(iv) KH_2PO_4 …… 0.15 g/L
(v) 葡萄糖 …… 1.1 g/L
(vi) pH …… 7.2

11.2.3 CMF/GASP

含 GASP 抗生素的 CMF-Saline G (见 11.2.1 节)

11.2.4 胰蛋白酶/EDTA

胰蛋白酶 0.25%，Na_2EDTA 0.5 mmol/L，溶于 CMF-Saline G

11.2.5 DMEM/F-12/GASP

溶有 GASP 抗生素的 DMEM/F-12 (见 11.2.1 节)

11.2.6 LSC 培养基

DMEM/F-12 包括：

(i) FBS ………… 5%
(ii) 人表皮生长因子（EGF） ………… 20 ng/ml
(iii) 谷氨酰胺 ………… 4 mmol/L
(iv) 三碘甲腺原氨酸（Triiodothyronine） ………… 2 nmol/L
(v) ITS
　　胰岛素 ………… 5 μg/ml
　　转铁蛋白 ………… 5 μg/ml
　　亚硒酸 ………… 5 ng/ml
(vi) 氢化可的松 ………… 0.5 μg /ml
(vii) 霍乱毒素 ………… 30 ng/ml
(viii) 腺嘌呤 ………… 0.18 mmol/L
(ix) GASP 抗生素（见 11.2.1 节）

11.2.7　DMEM/10FB/GASP

DMEM 含 10% FBS 及 GASP 抗生素（见 11.2.1 节）

11.2.8　用于培养人角膜基质干细胞的改良 Jiang 培养基（MJM）

DMEM/MCDB-201，60∶40
(i) 胎牛血清（FBS） ………… 2%
(ii) 表皮生长因子（EGF） ………… 10 ng/ml
(iii) 血小板衍生的生长因子（PDGF-BB） ………… 10 ng/ml
(iv) ITS（见 11.2.5）
(v) 白血病抑制因子（LIF） ………… 200 U/ml
(vi) 亚油酸-牛血清白蛋白（LA-BSA） ………… 1 mg/ml
(vii) 抗坏血酸-2-磷酸盐（Ascorbic acid-2-phosphate） ………… 0.1 mmol/L
(viii) 地塞米松 ………… 1×10^{-8} mol/L
(ix) GASP 抗生素（见 11.2.1 节）

11.2.9　HBSS/2FB

含 2% FBS 的 Hanks' BSS

11.2.10　DMEM/2FB

含 2% FBS 的 DMEM

11.2.11　角膜细胞诱导培养基

Advanced D-MEM (Invitrogen)：
(i) 成纤维细胞生长因子（FGF-2） ………… 10 ng/ml
(ii) 抗坏血酸-2-磷酸盐 ………… 0.1 mmol/L

11.2.12 成软骨细胞诱导分化培养基（CDM）

DMEM/MCDB-201，60∶40

(i) FBS ……………………………………………………………………… 2%

(ii) 抗坏血酸-2-磷酸盐 …………………………………………………… 0.1 mmol/L

(iii) 地塞米松 …………………………………………………… 1×10^{-7} mol/L

(iv) TGF-β …………………………………………………………… 10 ng/ml

(v) 丙酮酸钠 …………………………………………………………… 100 μg/ml

11.2.13 成神经诱导分化培养基（NDM）

Advanced D-MEM：

(i) 表皮生长因子（EGF） …………………………………………… 10 ng/ml

(ii) FGF-2 …………………………………………………………… 10 ng/ml

(iii) 全反式维甲酸 …………………………………………………… 1 μmol/L

11.2.14 角膜内皮细胞培养基（CECM）

DMEM/F-12，1∶1

(i) FBS ……………………………………………………………………… 2%

(ii) FGF-2 …………………………………………………………… 10 ng/ml

(iii) EGF ……………………………………………………………… 10 ng/ml

(iv) PDGF-BB ………………………………………………………… 10 ng/ml

(v) ITS，1×（见 11.2.6）

(vi) 抗坏血酸-2-磷酸盐 ……………………………………………… 0.1 mmol/L

(vii) GASP 抗生素（见 11.2.1 节）

11.2.15 内皮细胞球培养基（ESM）

DMEM/F-12，1∶1

(i) 甲基纤维素 …………………………………………………………… 1.5%

(ii) B27 补充剂：1×

(iii) FGF-2 …………………………………………………………… 10 ng/ml

(iv) EGF ……………………………………………………………… 20 ng/ml

(v) GASP 抗生素（见 11.2.1）

11.2.16 SDS 样本缓冲液（6×）

(i) Tris · HCl，0.5 mol/L，pH 6.8 ……………………………………… 7 ml

(ii) 丙三醇 ……………………………………………………………… 3 ml

(iii) SDS ………………………………………………………………… 1 g

(iv) 溴酚蓝 ……………………………………………………………… 1.2 mg

6×浓度的原液：0.35 mol/L Tris，30% 丙三醇（*V/V*），10%（*W/V*）SDS，

0.012%（*W*/*V*）溴酚蓝。

使用终浓度：0.058 mol/L Tris，5% 丙三醇（*V*/*V*），1.67%（*W*/*V*）SDS，0.002%（*W*/*V*）溴酚蓝。

11.2.17　封闭缓冲液

PBSA ＋ 0.5% BSA ＋ 2%正常羊血清

11.3　人角膜缘干细胞（LSC）的培养

尽管边群细胞可以通过流式（FACS）的方法从角膜缘上皮细胞中分离并鉴定，但这一纯化手段并不广泛适用于分离较纯的用于培养的有活性的 LSC 群体。经典的方法是在体外将未纯化的人角膜缘干细胞群在适合干细胞扩增的条件下进行培养和传代。通过这种方法培养的细胞已经用于体内移植治疗角膜缘干细胞缺乏。体外培养 LSC 有三种方法：在塑料培养皿上培养、在羊膜上培养和在饲养细胞层上培养。作者对在塑料培养皿和羊膜上面培养进行了比较，结论是在人羊膜上培养能够抑制角膜缘干祖细胞分化并促进它们的增殖［Du et al.，2003］。Tseng 和他的合作者认为用丝裂霉素 C 处理过的小鼠 3T3 细胞作为饲养层的培养系统能够更好的促进角膜缘干祖细胞的克隆生长［Tseng et al.，1996］。下面我们将分别介绍这些不同的培养体系。

注意：人来源的组织细胞应当在生物安全 2 级的实验室进行处理，使用经管理委员会认证过的适用于这一操作的层流超净台（见第 1 章）和个人防护服。应当获取每一个捐赠者的血清进行检测，以除外 HIV 和肝炎病毒的污染。

11.3.1　基质的制备

方案 11.1　制备人的羊膜（HAM）

试剂和材料

灭菌

□ 人胎盘。

注意：必须在捐赠者知情同意的情况下获取人体组织，使用伦理委员会认可的知情同意书。保证捐献者的匿名权，操作过程符合赫尔辛基宣言，注意生物安全。

□ PBSA/GASP（见 11.2.1 节）

□ 丙三醇

□ 含 50%丙三醇的 DMEM

□ 胰蛋白酶/EDTA（见 11.2.4 节）

□ Millicell 微孔膜组织培养插片（Millicell microporous membrane tissue culture insert）

□ 塑料刮片和无菌棉拭子

步骤

(a) 用 PBSA/GASP 清洗组织。

(b) 分离人羊膜，用戴手套的手从胎盘上将羊膜钝性分离下来，分离出的羊膜薄层包括上皮细胞，基底膜和一些基质组织。

(c) 用无菌棉拭子除去基底膜下的基质组织，使分离的羊膜尽可能的薄。

(d) 在检测供者血清以除外疾病的时期，可以将粗分离出的人羊膜保存在含有50%丙三醇的 DMEM 中，−70℃存放。

(e) 临用前解冻人羊膜，用 PBSA 清洗后将其切成直径约为 2mm 的小块。

(f) 用胰蛋白酶/EDTA 消化组织块，37℃，30min。

(g) 用塑料刮片轻刮消化过的人羊膜，除去上皮细胞，注意不要破坏基底膜。

(h) 用 PBSA 清洗裸露的羊膜，并将它的基底膜面（去除上皮细胞的面）黏附在 Millicell 微孔膜组织培养插片上。

方案 11.2　制备小鼠 NIH 3T3 成纤维细胞饲养层

试剂和材料

灭菌

☐ 小鼠 NIH 3T3 成纤维细胞
☐ DMEM/10FB/GASP（见 11.2.7 节）
☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 11.2.4 节）
☐ 丝裂霉素 C（MMC），500 μg /ml 溶于水。
☐ 塑料组织培养瓶，25 cm^2 或 75 cm^2
☐ 组织培养 6 孔板

非灭菌

☐ 任选（可选择用丝裂霉素 C 处理）：Gamma 或 X 射线照射
☐ 低速低温离心机

步骤

(a) DMEM10FB/GASP 培养 NIH 3T3 成纤维细胞，接种于 25 cm^2 或 75 cm^2 组织培养瓶。

(b) 细胞接触汇合后加入 MMC (5 μg /ml) 37℃，2h。

(c) 胰蛋白酶消化后将细胞以 2×10^4 个细胞/cm^2 的密度铺于 3.5 cm 培养平皿或 6 孔板。

(d) 如不用 MMC 处理，可以用 ^{60}Co 或 X 射线放射源 60Gy 照射铺满 3T3 细胞的培养皿。照射后细胞不再进行有丝分裂但仍能黏附在培养皿上作为饲养层使用。

方案 11.3　收集角膜上皮细胞和分离干细胞

试剂和材料

灭菌

☐ 完整的人角膜（安全注意事项见 11.3 节）
☐ CMF-Saline G（见 11.2.2 节）
☐ 中性蛋白酶 II，1.2 U/ml（用 DMEM/F-12/GASP 稀释 2.4 U 中性蛋白酶 II）
☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 11.2.4 节）
☐ DMEM/F-12/GASP（见 11.2.5 节）
☐ DMEM/F-12/2FB/GASP：DMEM/F-12/GASP 含 2% FBS
☐ CMF/GASP（见 11.2.3 节）
☐ LSC 培养基（见 11.2.6 节）
☐ 弯虹膜剪，11 cm（4-3/8 in.）
☐ Jeweler's 镊，10 cm（4 in.）
☐ 角膜剪，19mm 刃，尖头
☐ Colibri 缝线钳，0.1mm

非灭菌

☐ 可调速摇床
☐ 解剖显微镜
☐ 低速低温离心机
☐ 血细胞计数板

步骤

(a) 清洗角膜 3×5 min。
(b) 剪除残留的巩膜，结膜和虹膜。
(c) 加入 2 ml 中性蛋白酶 II，4℃过夜，轻微搅动。
(d) 将加入中性蛋白酶 II 的角膜放入 4℃摇床摇 30min。
(e) 用 DMEM/F-12/GASP 清洗角膜。
(f) 解剖显微镜下，小心去除角膜中央的上皮细胞（此时多数的中央上皮细胞已经剥脱）并除去角膜缘包含有 Vogt 栅栏区的色素上皮细胞。
(g) 用胰蛋白酶/EDTA 消化角膜缘上皮细胞片 37℃，10min。
(h) 加入等体积 DMEM/F-12/2FB/GASP。
(i) 400 *g* 离心 10 min，弃上清。
(j) 用 DMEM/F-12/2FB/GASP 洗一遍，离心，弃上清。
(k) 加入 LSC 培养基，将细胞拍散并用血细胞计数板计数。
(l) 将细胞以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种至铺有 3T3 饲养层的组织培养皿或准备好的人羊膜上。

(m) 每三天更换一次培养基。

(n) 当细胞达 90%汇合时用胰蛋白酶消化传代：

(i) 弃去培养基。

(ii) 用 CMF-Saline G 洗一遍。

(iii) 加入胰蛋白酶/EDTA 37℃，10min。

(iv) 当细胞开始收缩，加入等体积的 DMEM/F-12/2FB/GASP。

(v) 细胞计数。

(vi) 400 *g* 离心 10min。

(vii) 弃上清，加入足量新鲜培养基，接种密度为 $1\times10^4/cm^2$。

(o) 原代细胞也可以用冻存液冻存（见 11.4.4 节）。

11.3.2 LSC 鉴定和诱导分化

上文中曾提到 LSC 表达 ABCG2 和 p63，不表达 CX43、角蛋白 3 和 12，因此这些细胞可以用免疫染色、RT-PCR 和免疫印迹法进行鉴定。

11.3.2.1 LSC 分化

在气液交界面培养可以使 LSC 分化成复层上皮 [Espana et al.，2003；Wolosin et al.，2000]。将细胞接种至密理普 Millicell 培养插片上，使全部细胞均在 LSC 培养基的液面下生长。当细胞汇合后减少培养孔内培养液的体积，使得底层的细胞仍能够浸没在培养基中而顶部的细胞表面只有薄薄的一层培养液。必须每日检查培养基的位置。10～14 天后，细胞将形成复层的上皮细胞层。可以用标准的组织化学染色或 CX43 和角化蛋白 3 免疫染色对分化的细胞进行鉴定。

方案 11.4 培养的角膜缘干细胞的免疫染色

试剂和材料

非灭菌

☐ 一抗：

☐ ABCG2 ……小鼠单克隆 BXP-21 …… 1∶100

☐ 连接蛋白-43 ……兔多克隆 CX43 …… 1∶100

☐ 细胞角蛋白 3（K3） ……小鼠单克隆 AE5 …… 1∶500

☐ 细胞角蛋白 12（K12） ……兔多克隆 J7 …… 1∶200

☐ 二抗：

☐ 抗小鼠 IgG …… Alexa-488 …… 1∶2500

☐ 抗兔 IgG …… Alexa-546 …… 1∶1500

☐ 封闭抗体：PBSA 配制的 10%热灭活羊血清

☐ Trion X-100

☐ PBSA
☐ 多聚甲醛（PFA），将 16%原液用 PBSA 现配成 4%的工作浓度。
☐ Immu-Mount 防褪色封片剂
☐ 载玻片和#1 盖玻片
☐ 共聚焦显微镜

步骤

(a) 培养在塑料平皿或羊膜上的细胞。
(b) CMF-Saline G 洗一遍。
(c) 用新鲜配制的 4% PFA 室温固定 15min。
(d) PBSA 洗一遍。
(e) 0.1% Triton X-100 破膜 10min。
(f) 10%热灭活羊血清封闭非特异性结合位点。
(g) 样本与一抗室温孵育 1h。
(h) PBSA 洗 2 遍。
(i) 加入二抗室温孵育 1h。
(j) 用 PBSA 洗两遍。
(k) #1 盖玻片，用最小体积的防褪色的封片剂封片。
(l) 在荧光或共聚焦显微镜下用 40×油镜对样本进行观察。

方案 11.5　逆转录-PCR 鉴定角膜缘干细胞

试剂和材料

☐ 引物：

ΔN p63	CAG ACT CAA TTT AGT GAG
	AGC TCA TGG TTG GGG CAC
K12	CTA CCT GGA TAA GGT GCG AGC T
	TCT CGC ATT GTC AAT CTG CA
β-Actin	GAG GCG TAC AGG GAT AGC AC
	GTG GGC ATG GGT CAG AAG

☐ RNA 提取试剂盒，例如，RNeasy（Qiagen）
☐ Superscript II（Invitrogen）
☐ DNase I（Ambion）
☐ HotStar Taq（Qiagen）
☐ 6%丙烯酰胺凝胶电泳材料
☐ SYBR Gold（Invitrogen）

步骤

(a) 按 RNeasy 试剂盒的标准步骤提取 3.5 cm 平皿培养的干细胞的 RNA。

(b) 用 DNase I 处理后使用随机六核苷酸引物和 Superscript II 将 400ng 总 RNA 转录为 cDNA。

(c) 取 20 ng RNA 产物 cDNA 使用 HotStar Taq 进行 PCR。

循环条件：94℃ 2 min，94℃ 30 s，55℃ 45 s，72℃ 45 s，循环 35 次，72℃ 10 min。

(d) 用 6%丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物，SYBR Gold 检测。

11.3.2.2 免疫印迹

通过裂解细胞获得蛋白从而用免疫印迹的方法检测 CX43、角化蛋白 3 和 12 的步骤见 11.4 部分。细胞表面生物素化后可以从细胞裂解产物中免疫沉淀 ABCG2。抗体应用如前所述。

11.3.3 冻存

简单来说，LSC 冻存过程为胰蛋白酶消化、计数、离心、用冻存液以 (2～5) × 10^6 个细胞/ml 的密度重悬细胞，每只冻存管放入 1ml 细胞悬液。降温速率为 1℃/h，将冻存的细胞放入装满异丙醇的商业冻存盒，－80℃过夜。第二天将冻存管转入液氮。冻存液：70%培养基 (DMEM/F-12)，20% FBS，10%DMSO。临冻存细胞前配制冻存液。

11.3.4 其他方法和应用

LSC 可以用作角膜缘移植物培养或用 FACS 法分离边群细胞。

11.3.4.1 组织块培养法

用中性蛋白酶 II 消化人角膜后（见方案 11.3），分离角膜缘上皮层并剪成直径约 1mm 的小片。将这些小片接种至 3T3 饲养细胞层上（见方案 11.2）或羊膜的上皮细胞面上（见方案 11.1）。2～4 周时细胞将从组织中移行出来。

11.3.4.2 流式法分离角膜缘 SP 细胞

这一过程与细胞分选分离间质边群细胞的步骤相同，具体方法见下面的 11.4 部分。对于上皮细胞来说，只要胰蛋白酶消化后能够得到足够的细胞，不论是原代细胞还是传代的细胞均能被分选。

11.4 培养人角膜间质干细胞

角膜间质细胞，即已知的角膜细胞，表现为静息的表型，以独特的树突状形态为特征，在体内的增殖率非常低下近乎没有 [Jester et al.，1994；Zieske，2001]。在急性损伤时，角膜细胞开始有丝分裂，呈成纤维细胞形态，迁移至损伤区域 [Carlson et al.，2003；Jester et al.，1999]。在体外，原代的角膜细胞在无血清或低丝裂原血清培养基中能够维持静止状态，与体内静止的角膜细胞在细胞形态和基质分泌作用方面相似

[Beales et al., 1999; Jester et al., 1996]。胎牛血清能够使角膜细胞增殖，但是也能够使角膜细胞变为成纤维细胞或成肌纤维细胞 [Masur et al., 1996]。

11.4.1　分离间质细胞

分离和培养间质干细胞为在体内外研究角膜细胞提供了重要的来源。我们前面已经讲述了从原代培养的间质细胞中用 FACS 法分离 SP 细胞群从而得到人角膜间质干细胞的方法。分离得到的表达 ABCG2 的干细胞体外培养超过 100 次倍增后仍没有丧失分化为角膜细胞的能力 [Du et al., 2005]。类似于静息的角膜细胞，这些细胞分泌硫酸角质素蛋白聚糖 lumican、keratocan 和 mimecan 等用于鉴定角膜细胞的分子标志 [Funderburgh et al., 2001, 2003]。

方案 11.6　分离原代人角膜间质细胞

试剂和材料

灭菌

- ☐ 完整的人角膜（见 11.3 节和第 1 章）
- ☐ CMF-Saline G（见 11.2.2 节）
- ☐ 中性蛋白酶 II
- ☐ L 型胶原酶，1 mg/ml 在 DMEM/F-12/GASP 中
- ☐ CMF-Saline G 配制的 TrypLE Express 或 0.25% 胰蛋白酶
- ☐ DMEM//F-12/GASP（见 11.2.5 节）
- ☐ DMEM/F-12/2FB/GASP：DMEM/F-12/GASP 含 2% FBS
- ☐ CMF/GASP（见 11.2.3 节）
- ☐ 3.5 cm 塑料组织培养皿或 6 孔板
- ☐ 手术刀或单刃的安全刀片
- ☐ 细胞滤网，70μm 血液尼龙过滤网
- ☐ 塑料刮片，"Cell Lifter" 或"Cell Scraper"
- ☐ 弯虹膜剪，11 cm (4-3/8 in.)
- ☐ Jeweler's 镊，10 cm (4 in.)
- ☐ 角膜剪，19 mm 刀刃，尖头
- ☐ Colibri 缝线钳，0.1 mm

非灭菌

- ☐ SDS 样本缓冲液（见 11.2.16 节），使用终浓度：0.058 mol/L Tris，5% 丙三醇，1.67% SDS，0.002%溴酚蓝
- ☐ 可调速摇床
- ☐ 旋转培养仪
- ☐ 解剖显微镜

□ 低速低温离心机

步骤

(a) 用 CMF-Saline G 清洗角膜 3×5 min。
(b) 剪除残留的巩膜，结膜和虹膜。
(c) 加入 2 ml 1.2U 中性蛋白酶 II，4℃摇床摇动过夜。
(d) 将加入中性蛋白酶 II 的角膜 4℃摇 30min。
(e) 用 DMEM/F-12/GASP 洗涤角膜。
(f) 解剖显微镜下，小心去除上皮和内皮细胞。
(g) 用塑料刮片轻刮基膜的上皮细胞面和内皮细胞面。显微镜下观察，以确保完全去除这些细胞层。
(h) 用新鲜培养基清洗角膜基质一次。
(i) 用手术刀或安全刀片或精细手术剪将基质剪碎成 2mm 左右的小块。
(j) 用 DMEM/F-12/GASP 配制的胶原酶 37℃消化 3h，直到大多数组织消失。
(k) 400*g* 离心 10min，弃上清。
(l) 用 DMEM/F-12/GASP 重悬细胞，用 70 μm 细胞滤网过滤消化液，并离心。
(m) 重复上述清洗步骤两遍，每遍之后细胞计数。
(n) 用 MJM（见 11.2.8 节）将分离出的间质细胞重悬并以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种于塑料组织培养皿中。
(o) 每 3 天更换一次培养基。
(p) 当细胞达 90%汇合时用胰蛋白酶消化传代：
　(i) 吸出培养基。
　(ii) 用 CMF-Saline G 洗一次。
　(iii) 加入胰蛋白酶 或 TrypLE 至仅仅覆盖细胞，37℃，10min。
　(iv) 加入 DMEM/F-12/2FB 终止消化。
　(v) 细胞计数。
　(vi) 将重悬的细胞离心，弃上清。
　(vii) 用足量新鲜配制的 MJM 培养基将细胞重悬，以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种。

11.4.2 用流式法（FACS）分离间质 SP 细胞

方案 11.7 利用 Hoechst 33342 外流性质分选角膜间质干细胞

试剂和材料

灭菌

□ 2～4 代的间质细胞。

☐ HBSS/2FB（见 11.2.9 节）
☐ Hoechst 33342 染料，1mg/ml 水溶
☐ 碘化丙啶（PI），2mg/ml 水溶
☐ 维拉帕米，500 μg/ml 水溶
☐ DMEM/2FB（见 11.2.10 节）
☐ 胰蛋白酶/TrypLE：TrypLE Express 或 0.25%胰蛋白酶，溶于 CMF-Saline G
☐ MoFlo（或与其类似的）高速细胞分选仪，具备 350 nm 激发能力

步骤

(a) 胰蛋白酶消化 2～4 代的间质细胞。
(b) 细胞计数，用 DMEM/2FB 将细胞稀释至 1×10^6 个细胞/ml。
(c) 加入 5 μg/ml Hoechst 33342 染料，37℃，90min，每 20min 搅动一次。
(d) 对照组细胞在加入 Hoechst 33342 染料前，先加入 50 μg /ml 维拉帕米孵育 20min。
(e) 染色后，在 4℃环境下用 HBSS/2FB 将细胞洗两遍并离心，之后在冰上用冷 HBSS/2FB 重悬细胞。
(f) 于分选前加入 2 μg /ml PI 以鉴别无活性的细胞。
(g) 无菌条件下分选细胞，高速细胞分选仪，用 350 nm 激发。收集蓝色（670nm）和红色（450nm）荧光均减弱的细胞。边群细胞通过上述步骤与死细胞和完全被染料标记的细胞分离开并被收集起来。对照组要确保用维拉帕米先行孵育后使边群细胞消失。

此外，细胞也可以通过表达 ABCG2 蛋白的特性进行分选，但这一方法可能不能获得与边群细胞具有同等“干性”水平的细胞群体。

方案 11.8　用 ABCG2 表达特性免疫分选角膜间质干细胞

试剂和材料

灭菌
☐ 2～4 代的间质细胞
☐ PBSA/BSA：PBSA+0.5% BSA
☐ PBSA/2FB：含 2%FBS 的 PBSA
☐ 封闭缓冲液（见 11.2.17 节）
☐ 抗体：MAB 4155F，克隆 5D3 抗 ABCG2-FITC，或同型抗体-FITC

非灭菌
☐ 具有 488 nm 氩激光器和 525/20 带通滤波器的高速细胞分选仪

步骤

(a) 胰蛋白酶消化 2～4 代的细胞并计数。

(b) 400*g* 离心，10min。

(c) PBSA/BSA 洗一遍。

(d) 加入 10 μl 抗体（MAB 4155F、克隆 5D3 抗 ABCG2-FITC 或同型抗体-FITC），30min，置于冰上。

(e) 用 PBSA/BSA 洗一遍后离心。

(f) 用高压高速的细胞分选仪进行流式细胞分选术。488 nm 的氩激光发生器用于激发荧光素异硫氰酸盐，525/20 带通滤波器用于测量发射光。用侧向散射对前向散射的双参数图上的门来除外细胞碎片。收集至少 100 000 个细胞用于分析。

(g) 分选出的 ABCG2 阳性和阴性的细胞群可以用于检测它们的集落形成率，干细胞标志性基因的表达，以及继续传代用于更进一步的研究和体内移植等。

11.4.3　鉴定和诱导分化

11.4.3.1　干细胞鉴定

MJM 培养的间质干细胞表达 PAX6 和 ABCG2 等已分化的角膜细胞不表达的基因。

PAX6：干细胞在 MJM 中低密度培养时表达高水平的核 PAX6。干细胞以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种于 MJM 中，用 PBSA 配置的 4%多聚甲醛固定 10min，之后用 0.1% Triton X-100 破膜 10min，随后用 10%羊血清封闭，具体步骤见方案 11.4。细胞用 1∶100 稀释的抗 PAX6 抗体染色，并用胞浆肌球蛋白（CMII25）复染，随后加入二抗 Alexa-546 抗兔和 Alexa-488 抗小鼠 1h。细胞用荧光显微镜照相。

ABCG2：在细胞表面生物素化后可以通过免疫沉淀检测 ABCG2。细胞层用 PBSA 冲洗后加入 PBSA 配制的 1mg/ml 的 Sulfo-NHS-LC-Biotin 置于冰上孵育 15min。之后用 PBSA 将细胞层冲洗一遍，再用细胞刮轻刮细胞层并打散细胞。将细胞溶解在 0.5ml M-PER 中，并用 10 μl G 蛋白磁珠清洗。ABCG2 抗体（clone BXP-21）事先与 G 蛋白磁珠孵育，之后将满载 ABCG2 抗体的磁珠与样本孵育过夜。收集磁珠并用 PBSA 清洗一遍，通过在 SDS 样本缓冲液中加热的方法洗脱结合蛋白。将蛋白用 4%～20% SDS-PAGE gel 分离并转到 PVDF 膜上。生物素化的蛋白可以用链菌素-辣根过氧化物酶系统通过发光底物检测。

11.4.3.2　角膜细胞诱导分化

当干细胞分化为角膜细胞时，它们将不再表达 PAX6 和 ABCG2，而开始表达角膜细胞特有的标志。这些标志中最可靠的是蛋白多糖 keratocan 和氨基葡聚糖硫酸角质素。这些标志都可以用免疫染色或 Western blot 的方法检测。keratocan mRNA 也可以定量检测。

诱导分化：将细胞以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种于角膜细胞诱导培养基中（见 11.2.11 节）。每 2～3 天换一次液。1～2 周后细胞将被诱导为角膜细胞。

免疫检测黏蛋白：将培养基通过离子交换柱（SPEC-NH2 微柱型）可以分离出黏蛋白。用 0.2 mol/L NaCl，6 mol/L 尿素，0.02 mol/L Tris，pH 7.4 洗柱，用 0.5 ml 4

mol/L guanidine-HCl，0.02 mol/L Tris，pH 7.4 洗脱。将样品从水中透析出来并低压冻干。样品用 100 μl 0.1 mol/L 乙酸铵重悬，pH 6.5，并等量分为两份。一份样本在 37℃ 下 2mU/ml 角质素酶 II 和内源-β-半乳糖苷酶中消化过夜。将经过消化和未消化的样品标准化细胞数后在 4%～20% SDS-PAGE gel 中电泳，之后转至 PVDF 膜，用抗 keratocan 的 Kera-C 多克隆抗体和抗硫酸角质素的 J36 单克隆抗体进行免疫印迹检测。被消化过的样品不会与 J36 反应，而会有一条对应 keratocan 的 55kDa 的锐利条带。

定量 RT-PCR：定量 RT-PCR 按照 SYBR Green RT-PCR Reagents 的厂商说明书操作。反应条件为 95℃ 10min，95℃ 15s，60℃ 1min，40 个循环。反应体系为 50 μl，含 1×SYBR Green PCR 缓冲液，3 mmol/L Mg^{2+}，200 μmol/L dATP，dCTP，dGTP 和 400 μmol/L dUTP，0.025 U/ml AmpliTaq Gold polymerase，5 μl cDNA，以及最佳浓度的前向引物和反向引物（见表 11.1）。每个反应的解离曲线产生于 Gene-Amp ABI Prism 7700 序列检测系统，以证实没有非特异性扩增。每份 cDNA（检测 3 个复孔）扩增 18S rRNA 以标准化 RNA 的含量. 每份样本扩增的循环阈值（Ct）用 ABI Prism Sequence Detection System software 测定。mRNA 的相对丰度为 $2^{-\Delta Ct}$，其中 $-\Delta Ct$ 是电扩增的特异基因 cDNA 的 Ct 值减去 18S 的平均 Ct 值得来，并以它作为 2 的乘方。用 3 份单独的特异基因值取平均得出 means±SD。

表 11.1　检测人的角膜细胞表达的分化基因引物

Keratocan	ATC TGC AGC ACC TTC ACC TT
	CAT TGG AAT TGG TGG TTT GA
ABCG2	TGC AAC ATG TAC TGG CGA AGA
	TCT TCC ACA AGC CCC AGG
Pax6	CAA TCA AAA CGT GTC CAA CG
	TAG CCA GGT TGC GAA GAA CT
18S	CAA TCA AAA CGT GTC CAA CG
	TAG CCA GGT TGC GAA GAA CT

免疫染色：方法见 11.4.3.2，细胞的 ABCG2 和 PAX6 染色阴性，而用 Kera C 抗体染色则 keratocan 为阳性。

11.4.4　冻存

步骤与冻存角膜缘干细胞的步骤相同。

11.4.5　其他方法及应用

角膜间质干细胞具有克隆形成能力和多系分化潜能。这些特性可以用于确认分离出的细胞的干细胞特性。

11.4.5.1　克隆生长

间质干细胞在 MJM 培养基中能够成克隆生长。胰蛋白酶消化细胞并计数，用 MJM 将细胞稀释为 3 个细胞/ml 的浓度。将细胞悬液种入 96 孔板中的一半区域（A/2）每孔加入 0.1ml 细胞悬液。每孔 0.3 个细胞的比例使得一个孔内含有 2 个细胞的可能性非常低。2 周后，对有克隆生长的孔进行标记，并更换培养基。当细胞汇合时，用胰蛋

白酶消化细胞，并以 $1\times10^4/cm^2$ 的接种密度扩增。在进行诱导分化前建议进行单克隆培养。

11.4.5.2 成软骨潜能

哺乳动物的眼中从未观察到软骨细胞。因此，细胞表达软骨特异性基因和基因产物是证明具有多系分化潜能的重要标志（即多能干细胞特性）。成软骨分化培养基（CDM）含有 DMEM/MCDB-201，2% FBS，0.1 mmol/L 抗坏血酸-2-磷酸盐，10^{-7} mol/L 地塞米松，10 ng/ml TGF-β1 和 100 μg/ml 丙酮酸钠。用 CDM 重悬 2×10^5 个细胞，沉淀于 15ml 尖底离心管中。培养基每 3 天更换一次。沉淀培养 2～3 周。干细胞在成软骨条件下表达的 II 型胶原，聚集蛋白聚糖和 COMP 蛋白的 mRNA 可以用 RT-PCR 检测（引物见表 11.2），而这些 mRNA 不会在相似培养条件下培养的成纤维细胞或角膜细胞中出现。II 型胶原和 COMP 蛋白也可以在诱导分化的细胞的提取物中用蛋白印迹法检测。

表 11.2 RT-PCR 检测人的软骨特异性基因表达的引物

Collagen II	CCG GGC AGA GGG CAA TAG CAG GTT
	CAA TGA TGG GGA GGC GTG AG
COMP	ACA ATG ACG GAG TCC CTG AC
	AAG CTG GAG CTG TCC TGG TA
聚集蛋白聚糖（Aggrecan）	TGA GGA GGG CTG GAA CAA GTA CC
	GGA GGT GGT AAT TGC AGG GAA CA

11.4.5.3 神经细胞分化

干细胞成神经诱导在下述条件中进行：Advanced D-MEM，含 10ng/ml 表皮生长因子（EGF），10ng/ml FGF-2 和 1μmol/L 全反式维甲酸。维甲酸每三天补充一次，细胞诱导 2～3 周后神经生成。用 RT-PCR 法可以检测到神经胶质酸性蛋白（GFAP）和神经丝蛋白的 mRNA 表达上调。GFAP 和神经丝蛋白的增加也可以用 Western blot 检测。免疫荧光染色显示诱导后的细胞神经丝蛋白，GFAP 和 β-微管蛋白 III 阳性。过程如前所述，引物见表 11.3。

表 11.3 RT-PCR 检测人的神经特异性基因表达的引物

神经丝蛋白	GAG GAA CAC CAA GTG GGA GA
	CTC CTC CTC TTT GGC CTC TT
GFAP	ACT ACA TCG CCC TCC ACA TC
	CAA AGG CAC AGT TCC CAG AT

11.5 人角膜内皮干细胞的培养

科学家最初尝试分离并培养人角膜内皮干细胞（HCEC）大概在 40 年前。那时这些细胞在体外表现出极为有限的分裂能力。间质角膜细胞污染成为这项研究的技术难题。最近，Joyce 和他的同事们通过完整的剥离后弹力层而避免了角膜细胞的污染

[Chen et al., 2001; Joyce and Zhu, 2004; Zhu and Joyce, 2004]。人角膜内皮中是否存在干细胞仍有争论。Whikehart 和他的合作者 [2005] 认为角膜内皮干细胞可能存在于角膜内皮与小梁网的交界区。发生创伤后这一区域的细胞能够检测到端粒酶活性并能被 BrdU 标记 [Whikehart et al., 2005]。Yokoo 等证实来源于人角膜内皮的细胞在能够使神经干细胞形成神经球的培养条件下也能形成细胞球 [Yokoo et al., 2005]。Mimura 等 [2005b, c] 的研究显示在诱导神经球生成的条件下分离出的可能的干细胞能够有效地治疗大疱性角膜炎和角膜内皮缺乏的兔子模型。这些作者发现外周和中央的兔角膜内皮中含有大量的可能是干细胞的细胞，但是通过细胞球形成分析可以看出外周的角膜内皮相较于中央的角膜内皮含有更多的干细胞，且干细胞的自我更新能力更强 [Mimura et al., 2005a]。关于前体细胞/干细胞分化为角膜内皮的研究具有高度的临床相关性。HCEC 在体内很少或基本不增殖，且无角膜内皮功能是引起角膜混浊的最常见原因，因此产生了对角膜移植片的大量需求。

HCEC 细胞表达早期的可辨识的分子标志是用于鉴定设想的干细胞分化为角膜内皮细胞的重要工具。Foets 等 [1992a, b] 研究显示人角膜内皮细胞表达神经细胞黏附分子（N-CAM），细胞间黏附分子-1（ICAM-1），以及能用单克隆抗体 OKT9 检测的转铁蛋白受体 CD71。细胞的边缘相关闭合带-1（border-associated zonula occludens-1, ZO-1）是一种紧密连接蛋白，已经被广泛应用于鉴定角膜内皮细胞的形态和完整性 [Chen et al., 2001, 2005; Ide et al., 2006; Joyce, 2003; Petroll et al., 1997, 2001; Senoo and Joyce, 2000; Zhu and Joyce, 2004]。这些蛋白的抗体，特别是 N-CAM，抗转铁蛋白受体单克隆抗体 OKT9 和紧密连接蛋白 ZO-1 都已经实现商业化，这为鉴定人角膜内皮细胞提供了必要的工具。

对于分化的角膜内皮细胞最重要的鉴定是对其功能的鉴定。角膜内皮对于维持角膜的透明性具有特别的屏障功能和泵的功能。用 Ussing chamber（尤斯室）系统可以检测在体外用移植的细胞或内皮片重建的角膜的泵功能 [Amano, 2003; Mimura et al., 2004, 2005c; Wigham et al., 2000]。对泵功能最有效的分析方法是在动物体内观察角膜的透明性，将培养的细胞植入前房并使其定位于后弹力层 [Mimura et al., 2005b, c]。

11.5.1 分离和培养人角膜内皮细胞

方案 11.9 分离人角膜内皮细胞

试剂和材料

灭菌

- ☐ 完整的人角膜（见 11.3 节）
- ☐ CMF-Saline G（见 11.2.2 节）
- ☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 11.2.4 节）
- ☐ DMEM/F-12/GASP（见 11.2.5 节）
- ☐ DMEM/F-12/2FB：DMEM：Ham's F-12，1∶1，含 2% FBS

☐ CMF/GASP（见 11.2.3 节）
☐ 手术刀或单刃安全刀片
☐ 弯虹膜剪，11 cm（4-3/8 in.）
☐ Jeweler's 镊子，10 cm（4 in.）
☐ 角膜剪，19 mm 刃，尖头
☐ Colibri 缝线钳，0.1 mm

非灭菌
☐ 可调速摇床
☐ 离心机，低速可制冷的滚动细胞培养仪

步骤

(a) 用 PBSA 将角膜清洗 3 次，每次 5min。
(b) 剪除残留的巩膜，结膜和虹膜。
(c) 加入 2 ml 1.2U/ml 中性蛋白酶 II，4℃过夜，轻微搅动。
(d) 将加入中性蛋白酶 II 的角膜放入 4℃摇床摇 30min。
(e) 用 DMEM/F-12/GASP 清洗角膜。
(f) 解剖显微镜下，小心去除小梁网，剥离内皮层并用胰蛋白酶/EDTA 消化 37℃，30min。
(g) 加入同等体积的 DMEM/F-12/2FB 并拍散细胞。
(h) 离心 400*g*，10min，弃去上清。
(i) 加入 1 ml 培养基，轻柔的重悬细胞并计数。

方案 11.10　角膜内皮细胞的常规培养

试剂和材料

☐ 培养基：CECM（见 11.2.14 节）
☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 11.2.4 节）
☐ 6 孔板

步骤

(a) 将细胞接种于包被有 FNC 的 6 孔板中。
(b) 每 3 天换液一次。
(c) 当细胞 90%汇合时用胰蛋白酶消化传代。

方案 11.11　培养内皮细胞球

试剂和材料

☐ 培养基：ESM（见 11.2.15 节）
☐ 胰蛋白酶/EDTA（见 11.2.4 节）
☐ 未经组织培养处理的 24 孔板

步骤

(a) 胰蛋白酶消化细胞，方法见方案 11.10。

(b) 将分离出的细胞用培养基以 10 个细胞/ μl 的密度重悬，并接种于未经组织培养处理的 24 孔板中。

(c) 7 天后用胰蛋白酶消化细胞并离心收集细胞，继续接种。

11.5.2　鉴定和诱导分化

内皮细胞具有非常特异的细胞形态，会形成扁平的六边形细胞片层。H&E 染色可以用于鉴定细胞形状。在进行 ZO-1、N-CAM、OKT9 免疫染色之前，先用 PBSA 将细胞清洗一遍，然后用 100%丙酮于－20℃固定 10min，再用 PBSA 清洗，之后进行染色或 4℃保存于 50%丙三醇-PBSA 中直至染色。

11.5.3　其他方法和应用

内皮细胞也可以用组织块法培养。剥离内皮细胞层后，将其剪成直径 1mm 的小片，让后将这些小片的内皮细胞面朝下接种于培养皿中。细胞将会从组织中移行出来。当细胞汇合后消化传代，方法如前所述。

11.6　小结

角膜移植术是目前治疗角膜盲的唯一有效的方法。尽管在美国捐献的角膜数量可以满足临床上的需要，但是，在世界范围内仍有 800～1000 万患者因得不到角膜移植治疗而在忍受角膜盲的痛苦。此外，还有大量的患者排斥同种异体角膜移植物；同时由于角膜屈光手术的增加角膜的捐献也将减少，因为经过这类手术的角膜不再适于移植。因此人们对于发展人工的和生物工程制造角膜产生了巨大的兴趣。Griffith 等［1999］展示了等同于天然角膜的模拟角膜，这种角膜有三层角膜细胞并具有关键的物理和生理功能。这一研究使用的是通过转染逆转录病毒制造的永生化细胞，这使得这一组织工程组织不适用于人体移植。因此研究的焦点转向了干细胞作为细胞治疗的组织来源以及角膜组织工程。如果我们能用来源于角膜上皮，间质和内皮的干细胞来制造适于临床应用的人工角膜，那么千百万角膜盲的患者将从中受益。

11.7　材料和供应商清单

产　品	货　号	供　应　商
A/2 半面积微滴定板	3696	Corning
ABI Prism Sequence Detection System software		Applied Biosystems
丙烯酰胺/Bis，30%溶液（37.5∶1）	161-0158	Bio-Rad Laboratories
高级 D-MEM	12491-015	Invitrogen
两性霉素 B	A2411	Sigma-Aldrich
抗 ABCG2 抗体 FITC 标记的，克隆 5D3	MAB4155F	Chemicon
FITC 标记的抗体，小鼠 IgG2b 同型对照	CBL 602F	Chemicon
抗 ABCG2 抗体，克隆 BXP-21	MAB4146	Chemicon
抗连接蛋白 43（Cx43）抗体	71-007	Invitrogen
抗细胞浆肌球蛋白抗体	CMII 25	Developmental Studies Hybridoma Bank
抗 GFAP 抗体	MAB360	Chemicon
抗 K3 抗体	5551-3059	Biogenesis
抗小鼠 IgG Alexa-488	A11001	Invitrogen
抗 p63 抗体	ab3239	Abcam
抗 PAX6 抗体	PRB-278P	Covance
抗兔 IgG Alexa-546	A11034	Invitrogen
抗 β-微管蛋白	MABI637	Chemicon
抗转铁蛋白受体，OKT9/CD-71	14-0719	eBioscience
抗 ZO-1 抗体	40-220	Invitrogen
抗 N-CAM 抗体	C9672	Sigma-Aldrich
抗体，抗人细胞核	MAB1287	Chemicon
抗坏血酸-2-磷酸盐	A8960	Sigma-Aldrich
B27 生长补充物	17504-044	Invitrogen
细胞滤网，70μm 尼龙网	352350	BD Falcon
霍乱毒素	227037	Calbiochem
Colibri 缝线钳 0.1 mm	555063 FT	World Precision Instruments
胶原酶 L 型	C8176	Sigma-Aldrich
角膜剪，Wescott，19mm 刀刃，尖头	55541S	World Precision Instruments
地塞米松	D1756	Sigma-Aldrich
二甲基亚砜		Sigma-Aldrich
中性蛋白酶 II，100ml，2.4 U/ml	10295825001	Roche Applied Science
DNA 酶 I，无 RNA 酶	222	Ambion
DMEM（高葡萄糖）	11995065	Invitrogen
DMEM（低葡萄糖）	D5521-1	Sigma-Aldrich
DMEM/ F-12	D8900	Sigma-Aldrich
Dynabeads 蛋白 G	100-03D	Invitrogen
重组人 EGF	E9644	Sigma-Aldrich
Endo-β-牛乳糖	100812-1	Seikagaku
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	21225	Pierce Biotechnology Inc
胎牛血清	SV30014	HyClone
FGF-2	F0291	Sigma-Aldrich
FNC Coating Mix	0407	Athena Environmental Sciences Inc

续表

产　品	货　号	供　应　商
GeneAmp RNA-PCR kit	N8080143	Applied Biosystems Inc.
庆大霉素	G1379	Sigma-Aldrich
Hank's 平衡盐溶液 10×	H4641	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	B2261	Sigma-Aldrich
HotStar *Taq* 多聚酶	203203	Qiagen
氢化可的松	H0396	Sigma-Aldrich
Immu-Mount	9990402	ThermoShandon
虹膜剪，弯头，4-3/8 in	#54-6503	Codman
ITS（胰岛素，转铁蛋白和硒）	354350	BD Biosciences
Keratanase II	100455- 1	Seikagaku
白血病抑制因子	ESG1106	Chemicon
亚油酸-牛血清白蛋白	L8384	Sigma-Aldrich
MCDB-201	M6770-1L	Sigma-Aldrich
甲基纤维素	HSC001	R&D Systems
Millicell 微孔膜组织培养插件	PixO01250	Millipore Corp
丝裂霉素 C	M4287	Sigma-Aldrich
Mixer，变速倾斜台	M48725	Barnstead/Thermolyne
M-PER 溶解剂		Pierce
NIH/3T3 成纤维细胞	CRL-2752	ATCC
16%多聚甲醛溶液	M48725	Electron Microscopy Sciences (EMS)
青霉素—链霉素溶液	P0781	Sigma-Aldrich
磷酸缓冲盐溶液（10×）	70011-044	Invitrogen
塑料刮片	08-773-1	Fisher Scientific
血小板来源的生长因子	P4056	Sigma-Aldrich
碘化丙啶	P4170	Sigma-Aldrich
蛋白 G 磁珠		Invitrogen (Dynal)
全反式维甲酸	R2625	Sigma-Aldrich
RNeasy Mini kit	74104	Qiagen
丙酮酸	S8636	Sigma-Aldrich
SPEC，3m NH2 柱子	531-07-20	Ansys Diagnostics
链霉蛋白辣根过氧化物酶		BD Biosciences (Pharmingen)
Sulfo-NHS-LC-Biotin		Pierce
Superscript II 逆转录酶	18064-022	Invitrogen
SYBR Gold nucleic acid gel stain (10 000×)	S11494	Invitrogen
SYBR Green RT-PCR 试剂	4304886	Applied Biosystems Inc.
TBE (10×)	161-0741	Bio-Rad Laboratories
TE (100×)	BP1338-1	Fisher Scientific
TEMED	17919	Pierce Biotechnology Inc
TGF-β1	T1654	Sigma-Aldrich
组织培养皿和培养瓶	various	BD Biosciences (Falcon)
三碘甲腺原氨酸（triiodothyronine）	T6397	Sigma-Aldrich
Triton X- 100	BP 151-500	Fisher Scientific
TrypLE Express	12604-013	Invitrogen
维拉帕米（Verapamil）	V4629	Sigma-Aldrich

致谢

笔者感谢 Martha L. Funderburgh 创作了图 11.1 并帮助校对原稿。本工作由国立卫生研究院基金 EY09368 和 EY016415 资助。JLF 是 Jules and Doris Stein 防盲研究的教授。

（卢　姗　译）

参考文献

Amano, S. (2003). Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* **22**:S66–S74.

Beales, M.P., J.L. Funderburgh, J.V. Jester, and J.R. Hassell. (1999). Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **40**:1658–63.

Bourne, W.M., and H.E. Kaufman. (1976). Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am. J. Ophthalmol*. **81**:319–23.

Budak, M.T., O.S. Alpdogan, M. Zhou, R.M. Lavker, M.A. Akinci, and J.M. Wolosin. (2005). Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. *J. Cell Sci*. **118**:1715–24.

Cai, J., A. Cheng, Y. Luo, C. Lu, M.P. Mattson, M.S. Rao, and K. Furukawa. (2004). Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J. Neurochem*. **88**:212–26.

Carlson, E.C., I.J. Wang, C.Y. Liu, P. Brannan, C.W. Kao, and W.W. Kao. (2003). Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. *Mol. Vis*. **9**:615–23.

Chen, K.H., D. Azar, and N.C. Joyce. (2001). Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea* **20**:731–7.

Chen, W.L., D.L. Harris, and N.C. Joyce. (2005). Effects of SOV-induced phosphatase inhibition and expression of protein tyrosine phosphatases in rat corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res*. **81**:570–80.

Chen, Z., C.S. de Paiva, L. Luo, F.L. Kretzer, S.C. Pflugfelder, and D.Q. Li. (2004). Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* **22**:355–66.

Davanger, M., and A. Evensen. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* **229**:560–1.

de Paiva, C.S., Z. Chen, R.M. Corrales, S.C. Pflugfelder, and D.Q. Li. (2005). ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* **23**:63–73.

Du, Y., J. Chen, J.L. Funderburgh, X. Zhu, and L. Li. (2003). Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol. Vis*. **9**:635–43.

Du, Y., M.L. Funderburgh, M.M. Mann, N. SundarRaj, and J.L. Funderburgh. (2005). Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* **23**:1266–75.

Dua, H.S., V.A. Shanmuganathan, A.O. Powell-Richards, P.J. Tighe, and A. Joseph. (2005). Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br. J. Ophthalmol*. **89**:529–32.

Engelmann, K., J. Bednarz, and M. Valtink. (2004). Prospects for endothelial transplantation. *Exp. Eye Res*. **78**:573–8.

Engelmann, K., M. Bohnke, and P. Friedl. (1988). Isolation and long-term cultivation of human

corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**:1656–62.

Espana, E.M., M. Di Pascuale, M. Grueterich, A. Solomon, and S.C. Tseng. (2004). Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye* **18**:406–17.

Espana, E.M., T. Kawakita, A. Romano, M. Di Pascuale, R. Smiddy, C.Y. Liu, and S.C. Tseng. (2003). Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**:5130–5.

Foets, B., J. van den Oord, K. Engelmann, and L. Missotten. (1992a). A comparative immunohistochemical study of human corneotrabecular tissue. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **230**:269–74.

Foets, B.J., J.J. van den Oord, R. Volpes, and L. Missotten. (1992b). In situ immunohistochemical analysis of cell adhesion molecules on human corneal endothelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* **76**:205–9.

Funderburgh, J.L. 2000. Corneal proteoglycans. Marcel Dekker, New York. pp. 237–273.

Funderburgh, J.L., B. Caterson, and G.W. Conrad. (1986). Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea. *Dev. Biol.* **116**:267–77.

Funderburgh, J.L., M.L. Funderburgh, M.M. Mann, L. Corpuz, and M.R. Roth. (2001). Proteoglycan expression during transforming growth factor beta-induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J. Biol. Chem.* **276**:44173–8.

Funderburgh, J.L., M.M. Mann, and M.L. Funderburgh. (2003). Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J. Biol. Chem.* **278**:45629–37.

Funderburgh, M.L., Y. Du, M.M. Mann, N. SundarRaj, and J.L. Funderburgh. (2005). PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes. *FASEB J.* **19**:1371–3.

Goldberg, M.F., and A.J. Bron. (1982). Limbal palisades of Vogt. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **80**:155–71.

Goodell, M.A., K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, and R.C. Mulligan. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **183**:1797–806.

Griffith, M., R. Osborne, R. Munger, X. Xiong, C.J. Doillon, N.L. Laycock, M. Hakim, Y. Song, and M.A. Watsky. (1999). Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* **286**:2169–72.

Grueterich, M., E. Espana, and S.C. Tseng. (2002). Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**:63–71.

Hart, G.W.. (1976). Biosynthesis of glycosaminoglycans during corneal development. *J. Biol. Chem.* **251**:6513–21.

Hay, E.D., T.F. Linsenmayer, R.L. Trelstad, and K. von der Mark. (1979). Origin and distribution of collagens in the developing avian cornea. *Curr. Top. Eye Res.* **1**:1–35.

Hollingsworth, J., I. Perez-Gomez, H.A. Mutalib, and N. Efron. (2001). A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom. Vis. Sci.* **78**:706–11.

Ide, T., K. Nishida, M. Yamato, T. Sumide, M. Utsumi, T. Nozaki, A. Kikuchi, T. Okano, and Y. Tano. (2006). Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* **27**:607–14.

Jang, Y.K., J.J. Park, M.C. Lee, B.H. Yoon, Y.S. Yang, S.E. Yang, and S.U. Kim. (2004). Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J. Neurosci. Res.* **75**:573–84.

Jester, J.V., P.A. Barry, G.J. Lind, W.M. Petroll, R. Garana, and H.D. Cavanagh. (1994). Corneal

keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**:730–43.

Jester, J.V., P.A. Barry-Lane, H.D. Cavanagh, and W.M. Petroll. (1996). Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* **15**:505–16.

Jester, J.V., W.M. Petroll, and H.D. Cavanagh. (1999). Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog. Retin. Eye Res.* **18**:311–56.

Johnston, M.C., D.M. Noden, R.D. Hazelton, J.L. Coulombre, and A.J. Coulombre. (1979). Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp. Eye Res.* **29**:27–43.

Joseph, A., A.O. Powell-Richards, V.A. Shanmuganathan, and H.S. Dua. (2004). Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br. J. Ophthalmol.* **88**:393–8.

Joyce, N.C.. (2003). Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**:359–89.

Joyce, N.C., B. Meklir, S.J. Joyce, and J.D. Zieske. (1996a). Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**:645–55.

Joyce, N.C., S.E. Navon, S. Roy, and J.D. Zieske. (1996b). Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**:1566–75.

Joyce, N.C., and C.C. Zhu. (2004). Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea* **23**:S8–S19.

Kim, M., H. Turnquist, J. Jackson, M. Sgagias, Y. Yan, M. Gong, M. Dean, J.G. Sharp, and K. Cowan. (2002). The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin. Cancer Res.* **8**:22–8.

Konomi, K., C. Zhu, D. Harris, and N.C. Joyce. (2005). Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:4086–91.

Laing, R.A., L. Neubauer, S.S. Oak, H.L. Kayne, and H.M. Leibowitz. (1984). Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. *Ophthalmology* **91**:1129–34.

Lechner, A., C.A. Leech, E.J. Abraham, A.L. Nolan, and J.F. Habener. (2002). Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**:670–4.

Linsenmayer, T.F., J.M. Fitch, M.K. Gordon, C.X. Cai, F. Igoe, J.K. Marchant, and D.E. Birk. (1998). Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* **17**:231–65.

Linsenmayer, T.F., E. Gibney, and J.M. Fitch. (1986). Embryonic avian cornea contains layers of collagen with greater than average stability. *J. Cell Biol.* **103**:1587–93.

Lwigale, P.Y., P.A. Cressy, and M. Bronner-Fraser. (2005). Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties. *Dev. Biol.* **288**:284–93.

Martin, C.M., A.P. Meeson, S.M. Robertson, T.J. Hawke, J.A. Richardson, S. Bates, S.C. Goetsch, T.D. Gallardo, and D.J. Garry. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev. Biol.* **265**:262–75.

Masur, S.K., H.S. Dewal, T.T. Dinh, I. Erenburg, and S. Petridou. (1996). Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4219–23.

Mimura, T., S. Yamagami, S. Yokoo, M. Araie, and S. Amano. (2005a). Comparison of rabbit

corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:3645–8.

Mimura, T., S. Yamagami, S. Yokoo, T. Usui, K. Tanaka, S. Hattori, S. Irie, K. Miyata, M. Araie, and S. Amano. (2004). Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**:2992–7.

Mimura, T., S. Yamagami, S. Yokoo, Y. Yanagi, T. Usui, K. Ono, M. Araie, and S. Amano. (2005b). Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:3128–35.

Mimura, T., S. Yokoo, M. Araie, S. Amano, and S. Yamagami. (2005c). Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:3637–44.

Moore, J.E., C.B. McMullen, G. Mahon, and A.P. Adamis. (2002). The corneal epithelial stem cell. *DNA Cell Biol.* **21**:443–51.

Nakamura, T., F. Ishikawa, K.H. Sonoda, T. Hisatomi, H. Qiao, J. Yamada, M. Fukata, T. Ishibashi, M. Harada, and S. Kinoshita. (2005). Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:497–503.

Pellegrini, G., E. Dellambra, O. Golisano, E. Martinelli, I. Fantozzi, S. Bondanza, D. Ponzin, F. McKeon, and M. De Luca. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:3156–61.

Pellegrini, G., O. Golisano, P. Paterna, A. Lambiase, S. Bonini, P. Rama, and M. De Luca. (1999). Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J. Cell Biol.* **145**:769–82.

Petroll, W.M., P.A. Barry-Lane, H.D. Cavanagh, and J.V. Jester. (1997). ZO-1 reorganization and myofibroblast transformation of corneal endothelial cells after freeze injury in the cat. *Exp. Eye Res.* **64**:257–67.

Petroll, W.M., L. Ma, J.V. Jester, H.D. Cavanagh, and J. Bean. (2001). Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing. *Cornea* **20**:73–80.

Salehi-Had, H., L.S. Alvarenga, R. Isseroff, and I.R. Schwab. (2005). Factors modulating p63 expression in cultured limbal epithelial cells. *Cornea* **24**:845–52.

Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99**:507–12.

Schermer, A., S. Galvin, and T.T. Sun. (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal *keratin in vivo and* in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* **103**:49–62.

Schlotzer-Schrehardt, U., and F.E. Kruse. (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp. Eye Res.* **81**:247–64.

Senoo, T., and N.C. Joyce. (2000). Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**:660–7.

Sosnova, M., M. Bradl, and J.V. Forrester. (2005). CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells* **23**:507–15.

Sumide, T., K. Nishida, M. Yamato, T. Ide, Y. Hayashida, K. Watanabe, J. Yang, C. Kohno, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, and Y. Tano. (2006). Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J.* **20**:392–4.

Terunuma, A., K.L. Jackson, V. Kapoor, W.G. Telford, and J.C. Vogel. (2003). Side population ker-

atinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J. Invest. Dermatol.* **121**:1095–103.

Triel, C., M.E. Vestergaard, L. Bolund, T.G. Jensen, and U.B. Jensen. (2004). Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp. Cell Res.* **295**:79–90.

Tseng, S.C.. (1989). Concept and application of limbal stem cells. *Eye* **3** (Pt 2):141–57.

Tseng, S.C., F.E. Kruse, J. Merritt, and D.Q. Li. (1996). Comparison between serum-free and fibroblast-cocultured single-cell clonal culture systems: evidence showing that epithelial anti-apoptotic activity is present in 3T3 fibroblast-conditioned media. *Curr. Eye Res.* **15**:973–84.

Verfaillie, C.M.. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* **12**:502–8.

Wang, D.Y., Y.J. Hsueh, V.C. Yang, and J.K. Chen. (2003). Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**:4698–704.

Watanabe, K., K. Nishida, M. Yamato, T. Umemoto, T. Sumide, K. Yamamoto, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, and Y. Tano. (2004). Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett.* **565**:6–10.

Whikehart, D.R., C.H. Parikh, A.V. Vaughn, K. Mishler, and H.F. Edelhauser. (2005). Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol. Vis.* **11**:816–24.

Wigham, C.G., H.C. Turner, J. Swan, and S.A. Hodson. (2000). Modulation of corneal endothelial hydration control mechanisms by Rolipram. *Pflugers Arch.* **440**:866–70.

Wilson, S.E., J. Weng, S. Blair, Y.G. He, and S. Lloyd. (1995). Expression of E6/E7 or SV40 large T antigen-coding oncogenes in human corneal endothelial cells indicates regulated high-proliferative capacity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**:32–40.

Wolosin, J.M., X. Xiong, M. Schutte, Z. Stegman, and A. Tieng. (2000). Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**:223–55.

Wulle, K.G.. (1972). Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye. *Invest. Ophthalmol.* **11**:897–904.

Yang, A., R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R.T. Bronson, C. Tabin, A. Sharpe, D. Caput, C. Crum, and F. McKeon. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**:714–8.

Yokoo, S., S. Yamagami, Y. Yanagi, S. Uchida, T. Mimura, T. Usui, and S. Amano. (2005). Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:1626–31.

Zhou, S., J.D. Schuetz, K.D. Bunting, A.M. Colapietro, J. Sampath, J.J. Morris, I. Lagutina, G.C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, and B.P. Sorrentino. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **7**:1028–34.

Zhu, C., and N.C. Joyce. (2004). Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**:1743–51.

Zieske, J.D.. (2001). Extracellular matrix and wound healing. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **12**:237–41.

Zieske, J.D.. (2004). Corneal development associated with eyelid opening. *Int. J. Dev. Biol.* **48**:903–11.

Zinn, K.M., and S. Mockel-Pohl. (1975). Fine structure of the developing cornea. *Int. Ophthalmol. Clin.* **15**:19–37.

第12章　乳腺干细胞的培养

MARK A. LABARGE,[1] OLE W. PETERSEN,[2] and MINA J. BISSELL[1]

[1] Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, Berkeley, CA94720, USA [2] Structural Cell Biology Unit, Institute of Medical Anatomy, The Panum Institute, university of Copenhagen, DK-2200 Copenhagen N, Denmark. Corresponding author: MJBissell@lbl.gov

12.1　培养干细胞的必要性

按照传统定义，成体干细胞是组织特异性的，它们通常处于静止状态，在组织修复、生长或再生时才会活化。因此，在正常情况下，成体干细胞主要参与维持器官稳态。作为干细胞，必须符合基本标准，即能够自我更新和至少分化成一种细胞类型，且分化的细胞在干细胞所在组织具有正常的功能 [Tilll et al., 1964]。总体讲，一个细胞作为干细胞的最终证据是在生理环境下，该细胞能在单细胞水平上，通过克隆扩增生成有功能的组织，这一点可通过体内移植实验来完成。在哺乳动物，尤其是人体内研究成体干细胞的生物学特性是非常困难的。因为在任何组织中，这些干细胞所占的比例都很少，难以分离，并且很多情况下，细胞不能扩增。啮齿类和其他动物模型，不仅可以提供大量遗传同质的干细胞，还可以提供合适的生理微环境来研究干细胞的功能。与之相反，我们很难从人体取得活体组织标本，即使能够获得，通常这些标本的遗传特点也难以知晓。或许，最重要的是，由于缺乏临床试验，在人体内研究分离出的干细胞的功能异常困难。使用免疫缺陷或人源化的啮齿类动物，虽然很有用，但毕竟与人体存在差

别，不能完全反映人体内的情况，因此，为简化人类干细胞生物学的研究，讨论生理条件下的功能培养模型是非常必要的。

因为传统的二维细胞培养体系有很多人工假象，类似于伤口愈合状态，它的有用性经常受到干细胞生物学家的质疑。人原代细胞的培养确实很困难，因为这些细胞易于选择性生长和衰老。经过近 40 年的创新性工作，人们移植了其他研究领域的方法，解决了研究乳腺干细胞的很多问题。通过使用富含细胞外基质的三维培养体系或成纤维细胞饲养层或其他三维培养体系，研究人员在培养体系中成功再现了干细胞龛位中的许多关键因素，这些因素与生理条件密切相关。除了一些成功的二维培养方法，科研人员还描述了将乳腺干细胞作为乳腺球传代的方法，这些方法是继体外培养神经干细胞后发明的 [Dontu et al., 2003]。在二维培养体系中，永生化乳腺上皮中不同的细胞群体，并使之维持正常的表型，同时又避免衰老的方法是该领域中非常重要的进展。同时，这些方法又细化了在三维培养体系和小鼠移植物中进行功能和形态分析。总之，这些方法的联合应用可以使我们建立更易观察的试验模型来研究乳腺干细胞。本章主要讨论乳腺干细胞可被体外培养的证据并对一些不同的培养方法进行描述。

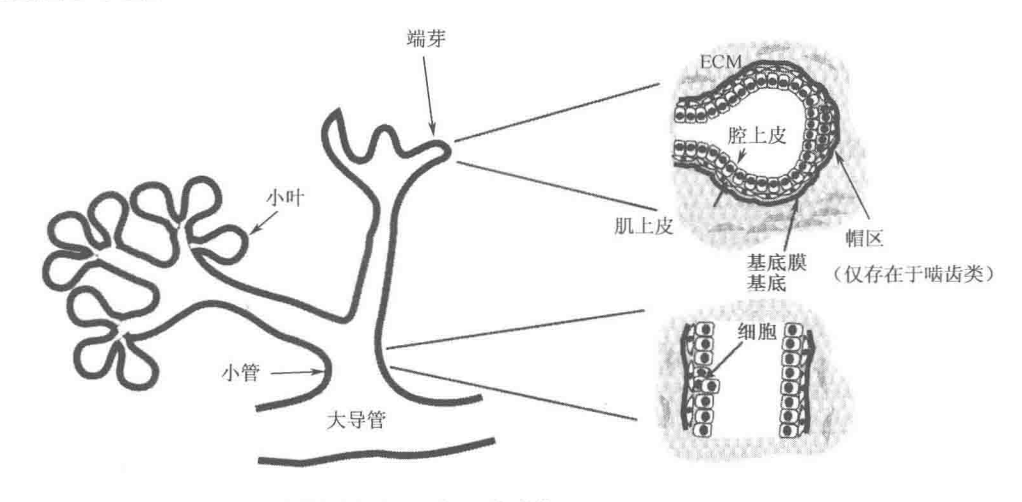
12.2 乳腺干细胞存在的证据

从干细胞生物学家的角度来看，乳腺是非常有趣的，因为它是一个雌激素依赖的器官并且其发育主要在成人期完成，所以，人们可以在成年动物身上实验性的重现该腺体发育的整个过程。乳腺是双层膜结构，至少含有两种基本细胞类型，即角蛋白 $K8^+/18^+$、唾液黏蛋白 $(Muc)^+$、内皮特异性抗原 $(ESA)^+$ 的导管上皮细胞和 $K14^+/5^+$，α-平滑肌肌动蛋白 $(\alpha\text{-SMA})^+$ 的肌上皮细胞（图 12.1） [Taylor-Papadimitriou and Lane，1987；Taylor-Papadimitriou 1989；Petersen and van Deurs，1988]。在怀孕过程中，乳腺达到最大的功能分化状态，此时，导管上皮细胞具有强大的分泌能力，参与乳汁合成与运输。最外层由肌上皮细胞组成，形成一个可收缩的装置，参与乳汁排出，此外，该层对组织极性的形成具有重要作用，研究还发现，该层可以作为抑制肿瘤的结构屏障。还有第三种细胞类型。根据表面标志物的表达 (Muc^-/ESA^+)，推断该种细胞位于导管上皮 (Muc^+/ESA^+) 和肌上皮 (Muc^-/ESA^-) 层之间。对小鼠乳腺的研究同样为该细胞的位置提供了依据，在这些研究中，这种细胞被称为小淡染细胞，位于近腔处，或直接位于基底膜上，或位于肌上皮细胞腔侧表面。已从人乳腺中分离出 $K14^+/5^+$，α- SMA^+ 的多能细胞，该种细胞位于基底膜之上。这些细胞可能是唯一可以被称为“基本”细胞的（很多文献在这一点有混淆，将肌上皮细胞也称为基底细胞），人们认为它们就是乳腺干细胞 [Gudjonsson et al., 2002b]。

人们最初考虑到乳腺干细胞存在，是因为观察到乳腺在细胞水平上活动旺盛。人类乳腺生长开始于青春期，此时，实质细胞从初级和次级导管末端生长，分支形成具有多个终末小管和小叶的复杂树状结构 [Medina and Daniel，1996；Russo and Russo，2004]。细胞增殖随月经周期发生波动。在怀孕过程中，乳腺小泡的数目增长了十倍，并且通过从已有终末小管分出侧枝，乳腺内形成了小叶 [Russo and Russo，2004]。分娩后，在接下来的哺乳期，乳腺在机体调控下，经过重塑，体积恢复到孕前状态。这一过程可在多次受孕时重复进行。这种细胞活动旺盛的现象使人们 [Taylor-Papadimitri-

ou，1983］推断人成体乳腺中存在一个前体细胞群体，能够生成新的小叶。

识别和分离干细胞的方法最初是由研究造血谱系的科研人员发明的［Till et al.，1964；Spangrude et al.，1988］，这些技术和概念为其他很多组织中干细胞的发现和分离提供了示例。



乳腺上皮细胞常见的识别标志物

腔	基底	肌上皮
角蛋白7	角蛋白5	角蛋白5
角蛋白8	角蛋白6a	角蛋白14
角蛋白18	角蛋白14	波形蛋白
角蛋白19	角蛋白19	CD10
Mucl	波形蛋白	αSMA
ESA	ESA	p63
Sca-1(小鼠)	CD10	
	Sca-1(小鼠)	

图 12.1　乳腺示意图

小叶和端芽（在人类中不是主要结构）均在乳腺示意图中显示出来。哺乳期小叶占主导（左侧分支），青春期端芽占主导（右侧分支）。端芽和小管的放大图显示推定干细胞所在区域。帽区主要存在于小鼠，人类没有帽区。“基底”细胞位于基底膜之上，在整个乳腺中均存在，人们认为这就是干细胞或祖细胞，但对它们的研究没有导管上皮细胞和肌上皮细胞清楚。

多个物种的研究发现总体上成体干细胞的分布很集中，并且不一定与短暂增殖的细胞共同存在。乳腺干细胞的存在位置和生物化学特性很复杂，部分原因是人们发现将乳腺的任何一个部分移植到去除上皮的乳腺脂肪垫中，均可以再生完整的乳腺［Deome et al.，1959］。Kordon 和 Smith［1998］采用逆转录病毒插入标记的方法，证明小鼠乳腺可以由单个细胞生成。最近，有两项研究在单细胞水平上明确证明小鼠体内，去除表达造血谱系标志物的细胞后，$CD29^+/CD24^+$［Shackleton et al.，2006］，或 $CD49f^+/CD24^+$［Stingl et al.，2006］的乳腺上皮细胞群体中富含具有克隆能力的细胞，可以在去除上皮的脂肪垫中定植并形成可产生乳汁的双膜乳腺。更为重要的是这种经克隆形成的乳腺可以连续移植到新的宿主，表明干细胞具有自我更新的能力。Shackleton 等

[2006] 也观察到在端芽的帽区，$CD29^+$ 和 $CD24^+$ 的免疫荧光共同存在，这一发现与先前的研究相符，提示小鼠乳腺中，大部分干细胞集中在帽区 [见 Kenny et al.，2001]。在干细胞抗原-1（Sca-1）启动子控制下表达绿色荧光蛋白的转基因小鼠体内，$Sca\text{-}1^{hi}$ GFP^+ 乳腺细胞中富含具有在去除上皮的脂肪垫中形成乳腺能力的细胞。$Sca\text{-}1^{hi}GFP^+$ 乳腺细胞在生长中的末芽远端数量很多，在管腔和基底部位也存在（见本节第一段）[Welm et al.，2002]。Kenney 等采用标记的方法，观察到推定的干细胞在小鼠的端芽和小管中均存在 [Kemy et al.，2001]。因此，我们可以认为在小鼠体内，乳腺干细胞是 $CD24^+/CD49f^+/CD29^+/Sca\text{-}1^+/Lin^-$ 的细胞，最有可能存在的部位是端芽，在小管中也存在。一旦乳腺完全发育，大约是 12 周-与种系有关，端芽即消失，此时对干细胞的位置就无从得知了。在人类，端芽的存在是短暂的，而且也不是主要的结构 [Howard and Guster son，2000]。此外，没有帽区，Sca-1 在人类中没有明确的同源蛋白，这些均提示需要使用不同的技术手段来识别人类乳腺干细胞。

过去的近四十年里，科研人员的研究主要围绕在寻找人乳腺干细胞存在的证据以及干细胞的特性，但因为上述的一些实验条件的限制，没有得到有力的结论。然而，一些研究人员已经分离出乳腺上皮细胞，并将它们体外培养，观察到类似干细胞的行为。但这些个别的报道不是结论性的，没有指出干细胞在乳腺中的位置或提供生物化学的方法来分离这些干细胞。由于不能将一个人的干细胞移植到另一个人体内来验证干细胞形成乳腺的能力，所以，目前我们关于人乳腺干细胞的知识主要来源于许多不同的细胞培养模式。以下讨论这些细胞培养模式（见 12.4 节）。

12.3 乳腺细胞培养基的组成

12.3.1 CDM3 基础培养基

自 [Petersen et al.，1990]

DMEM/F12，1∶1，其中加入：

(i) 亚硒酸钠 ………… 2.6ng/ml
(ii) 上皮生长因子（EGF） ………… 100 ng/ml
(iii) 氢化可的松 ………… 0.5μg/ml
(iv) 三碘甲状腺氨酸 ………… 10nmol/L
(v) 纤维连接蛋白 ………… 100ng/ml
(vi) 谷氨酸盐 ………… 2mmol/L
(vii) 转铁蛋白 ………… 25μg/ml
(viii) 双丁酰基 cAMP ………… 10nmol/L
(ix) 磷酸乙醇胺 ………… 0.1mmol/L
(x) 胎球蛋白 ………… 20μg/ml
(xi) 维生素 C ………… 0.06mmol/L（10μg/ml）
(xii) 牛血清白蛋白 ………… 0.01%
(xiii) HEPES 缓冲液 ………… 10mmol/L
(xiv) GIBCO 微量元素混合物 ………… 1∶100

(xv) 胰岛素 …………………………………………………… 3.0μg/ml
(xvi) 17β-雌二醇 ……………………………………………… 0.1nmol/L
(xvii) 乙醇胺 ………………………………………………… 0.1mmol/L

12.3.2　CDM4

按照 [Petersen and van Deurs，1988] 修改 CDM3 基本培养基如下：
(i) 降低 EGF 浓度至 20ng/ml
(ii) 增加 cAMP 浓度至 10μmol/L
(iii) 加入 10 ng/ml 霍乱毒素

12.3.3　CDM6

按照 [Pechoux et al.，1999] 改良的 CDM3 基本培养基如下：
(i) 加入 10 ng/ml 重组人肝细胞生长因子
(ii) 降低 EGF 浓度至 20ng/ml

12.3.4　H14

DMEM/F12，1∶1，其中加入：
(i) 胰岛素 …………………………………………………… 250ng/ml
(ii) 转铁蛋白 ………………………………………………… 20μg/ml
(iii) 亚硒酸钠 ………………………………………………… 2.6ng/ml
(iv) 雌二醇 …………………………………………………… 0.1nmol/L
(v) 氢化可的松 ………………………………………………… 1.4μmol/L
(vi) 泌乳素 …………………………………………………… 5μg/ml

12.3.5　乳腺球生长培养基

按照 [Dontu et al.，2003] 改良的乳腺上皮细胞生长培养基如下：
(i) B27 补充物 ……………………………………………… 2%
(ii) EGF …………………………………………………… 20ng/ml
(iii) b-FGF ………………………………………………… 20ng/ml
(iv) 肝磷脂 …………………………………………………… 4μg/ml

12.3.6　乳腺球分化培养基

按照 [Dontu et al.，2003] 在 Ham'F-12 中加入下列试剂：
(i) 胎牛血清 ………………………………………………… 5%
(ii) 胰岛素 …………………………………………………… 5μg/ml
(iii) 氢化可的松 ……………………………………………… 1μg/ml
(iv) 霍乱毒素 ………………………………………………… 10μg/ml
(v) EGF …………………………………………………… 10ng/ml

12.3.7 MCF-10A 培养基

DMEM/F12，1∶1，其中加入：

(i) 马血清 ………………………………………………………………………… 5%
(ii) EGF ……………………………………………………………………… 20ng/ml
(iii) 氢化可的松 ……………………………………… 0.5μg/ml (1.4μmol/L)
(iv) 霍乱毒素 …………………………………………………………… 100ng/ml
(v) 胰岛素 …………………………………………………………………… 10μg/ml

12.4 乳腺干细胞培养模式

12.4.1 啮齿动物来源的乳腺干细胞

原代乳腺干细胞培养是一项很重要的基本技术，它是在乳腺细胞中进行基因修饰，富集亚细胞群体和谱系细胞追踪实验的基础。啮齿类动物乳腺上皮在体外相对容易培养，对它的研究为人组织的研究铺平了道路。然而，在体外培养条件下研究乳腺干细胞生物学所得到结论，很多都难以应用到体内情况，因为这些研究对于多潜能的判断仅仅依靠形态学标准这一项。

应用这一标准，Rudland 和同事分离培养了最早的干细胞系之一，并描述了这一干细胞系的特征，该干细胞系来自于大鼠 [Bennett et al.，1978]。这些细胞命名为 RAMA25，是从二甲基苯并蒽诱导的肿瘤组织中分离出来的，在含有血清的培养基中培养，呈立方形，能够生成伸长的，小滴状的细胞（如图 12.2）。通过比较这些细胞与体内乳腺细胞的形态差别，人们认为体外培养的这些细胞分别是体内的导管上皮、肌上皮和导管分泌细胞。随后 RAMA25 来源的长形细胞经克隆化分离和扩增，被命名为 RAMA29，该种细胞只能生成更为长形的细胞。在含有泌乳素的培养基中，RAMA25 长至汇合，能够生成圆顶状细胞，用多克隆抗血清免疫可以表达酪蛋白。将 RAMA25 注入小鼠体内可以形成肿瘤，研究人员发现肿瘤内含有小管，并且部分区域呈肉瘤样和腺肉瘤样。虽然该实验中没有采用最新乳腺干细胞移植实验中应用的特定标志物，但肿瘤的异质性提示细胞具有多潜能的表型。有趣的是，RAMA29 细胞不能在小鼠体内成瘤，这一点与人体内肌上皮瘤很罕见，且分化的肌上皮细胞通常在体外难以传代的观察相符合 [Petersen and ban Deurs]。早期意图确定培养中乳腺干细胞的想法持续了很久，并且还用作之后许多试验的模型。然而，技术进步很快，而且已经不使用恶性或转化细胞进行研究。

在培养实验中使用啮齿类动物来源细胞的一个显著优势是这些细胞是可自发性永生化，且具有相对正常的表型。小鼠 COMMA-D 细胞系是从正常的孕中期小鼠体内分离出来的，该细胞系可以在去除上皮的乳腺脂肪垫中形成双层膜结构的腺体 [Medina et al; 1986]。从该细胞系中获得一个亚型，命名为 COMMA-Dβ，高表达 Sca-1，且具有其基本特征，即 K8/18 阴性、K5 和 K6 阳性、α- SMA 阴性 [Deugnier et al.，2006]。在二维培养体系中，这些细胞可以生成导管细胞和肌上皮细胞，且效率较其前体细胞高；可以在去除上皮的乳腺脂肪垫中定植，此外这些细胞在三维 lrECM 培养中能够克

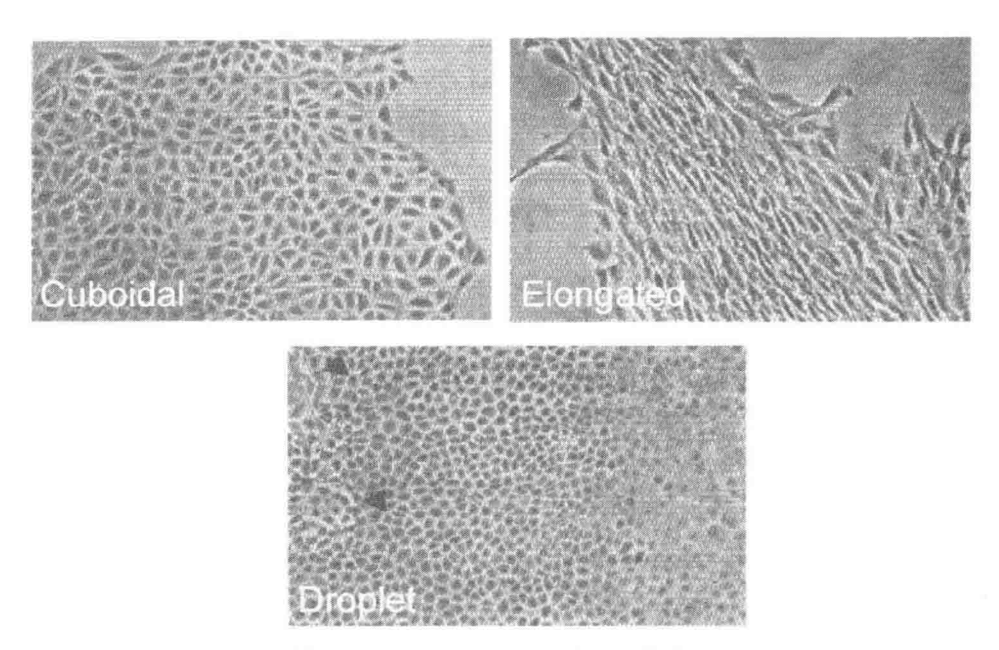


图 12.2　RAMA25 来源的乳腺细胞类型

Bennett 等描述了三种形态不同的细胞类型的集落［1978］。在小滴状细胞的集落中可见圆顶（箭头），细胞表达酪蛋白（图中未显示）。

隆性生成球体，分界明显，K8$^+$ 细胞在内侧，K5$^+$ 细胞在外侧。这些球体是否具有极性或含有腺腔，尚未见报道。将球体分离，再次种植到三维 lrECM，可以生成新的球体，且细胞可以自我更新。后一点很关键，因为培养体系中细胞增殖和干细胞自我更新有很大的区别。虽然体外培养的细胞可以分裂，使细胞数目增加，但干细胞的特性是在生成或再生整个组织（分化）的同时，维持自身（自我更新）。COMMA-Dβ 细胞系是一个很好的例子，它具有干细胞的很多特性，同时又是接近正常的，永生化的小鼠细胞系。

12.4.2　人来源的乳腺干细胞

正常的人乳腺上皮常取自乳房缩小整形术标本，这些组织含有乳腺中所有的细胞组分。另外一个来源是乳汁，其中只含有分化的导管上皮系细胞。这一来源得到的细胞在培养基中的寿命很短，通常只能经过 1～5 次传代，虽然有报道 SV40 可以使细胞永生［见 Ratsch et al. 综述，2001；Dimri et al.，2005］。由于这些限制，本章不讨论乳汁来源的细胞，但我们应该知道它可以作为乳腺细胞的来源。与 Rudland 和同事的描述相似［Bennet et al.，1978］，乳房缩小整形术标本中获得的原代细胞可以产生三种形态不同的细胞类型，但不是每次实验三种细胞类型均同时出现［Dimri et al.，2005］。最初从乳房缩小整形术组织中成功培养出原代乳腺上皮细胞，采用的培养基含有血清以及氢化可的松、上皮生长因子、雌激素和孕激素，但这些细胞传代 1～4 次后即衰老［Stampfer et al.，1980］。对培养基改进后，研究人员可以选择性的培养乳腺上皮的亚细胞群，全部为肌上皮样细胞或导管上皮样细胞，并逐步使用无血清的合成培养基。有两个主要的进展：一个是使用霍乱毒素作为添加剂，可以增加 cAMP［Stampfer，

1982]；另外一个是将培养基中钙的浓度减少了近 17 倍，约 0.06mmol/L [Soule and McGrath，1986]。使用经过改进的培养基，克隆可以生长 50 代之多 [Soule and McGrath，1986]。借助于这些培养基，从良性纤维囊性乳腺病患者病变部位获得了 MCF10A 细胞系，该细胞具有自发性永生化（见 12.3.7 培养基组成）。与 RAMA25 细胞系相似，表达 HA- ras 的 MCF10A 形成的肿瘤中可见双层结构的小管，提示该种细胞具有一些干细胞的特征 [Dawson et al.，1996]。采用与获取 MCF10A 相似的方法，获得了一个新的细胞系 MCF15，该细胞在二维培养体系和在裸鼠身上形成的肿瘤肿中均表现出多系分化潜能 [Shen et al.，2006]。但鉴于这种细胞是恶性的，它们只能代表培养技术的进步，不能作为研究人干细胞生物学的好例子。

12.4.2.1　乳房缩小整形术组织标本中的细胞分离与培养

乳房缩小整形术中获得的组织标本可以用胶原酶消化分离。得到的粗消化物经过离

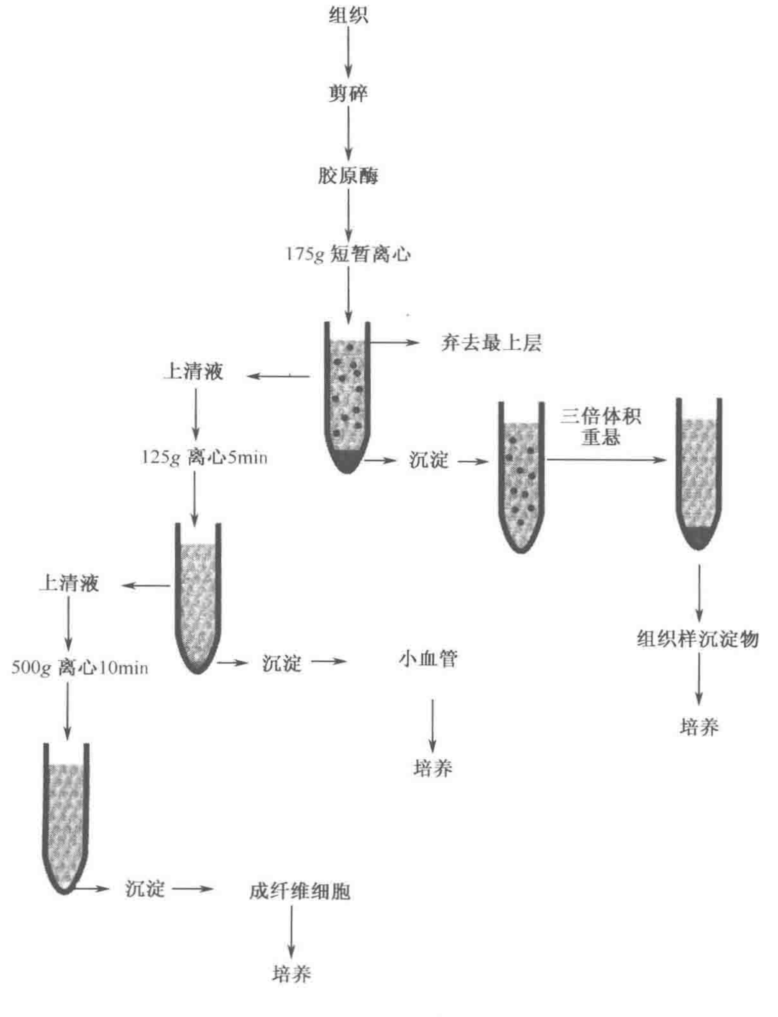


图 12.3　颗粒物的选择

流式图显示胶原酶消化后通过选择性离心分离不同的部分（可见彩图 14）。

心，沉淀后主要形成三层（见图 12.3；彩图 14）每一层可种植到 Vitrogen 包被的 $25cm^2$ 培养瓶中。

方案 12.1　乳房缩小整形术组织标本中上皮细胞的制备

试剂和材料

无菌

- ☐ DMEM/F12，50∶50，加入 1.2mg/ml 重碳酸盐
- ☐ CMD3 培养基（见 12.3.1 节）
- ☐ 胶原酶，900IU/ml
- ☐ Vitrogen
- ☐ 解剖刀
- ☐ 培养瓶，$25cm^2$，Vitrogen 包被，$8\mu g/cm^2$

非无菌

- ☐ 摇床
- ☐ 离心管

步骤

(a) 手术后，立即将组织标本转移至 DMEM/F12（1∶1）。

(b) 用两把解剖刀（每只手一把）将组织剪成约 2mm 的小块。

(c) 置摇床上（60r/min），37℃，胶原酶消化 24～48h。

(d) 离心消化物数秒钟，175*g*，

(i) 脂肪和富含脂质的细胞漂浮于上清液的上方，将其弃去；

(ii) 上清液中主要含有血管来源的小粒和单个细胞；

(iii) 沉淀中含有血管和上皮来源的较大组织样颗粒。

(e) 用 10ml DMEM/F12 重悬沉淀。在 30s 内，上皮来源的组织样大颗粒会沉淀，血管来源部分则悬浮于培养基中。因为它们最终也会沉淀下来，所以应该同上皮来源的组织样大颗粒分离。通常，再经过两轮重悬沉淀，就可以将上皮来源的组织样大颗粒与血管分离。

(f) 离心 d 步骤中的上清液，125*g*，5min。沉淀中含有小血管。弃去上清，离心，500*g*，10min，则沉淀中含有成纤维细胞。

(g) 将上皮来源的小粒，种植到 Vitrogen 包被的 $25cm^2$ 培养瓶中。必要时，其他部分也可种植。

(h) 加入 CDM3 培养基（见 12.3.1 节），培养瓶置于 37℃，5% CO_2 温箱中。

随着体外培养人原代细胞模式的发展，出现了不同的机制来解释人乳腺如何维持稳态，主要包括分级分化和相互转变，通过流式细胞仪，分离出唾液黏蛋白阳性，CD10

阴性，上皮特异性抗原阳性的细胞（$Muc^{+}/CD10^{-}/ESA^{+}$），$Muc^{-}/CD10^{+}/ESA^{+}$细胞和$Muc^{-}/CD10^{-}/ESA^{-}$细胞，并在体外培养体系中对这些细胞的功能进行研究。在含有胎牛血清的培养基中，二维培养的$Muc^{-}/CD10^{+}/ESA^{+}$细胞，可以生成混合克隆，ESA^{+}/Muc^{+}导管细胞在内侧，K^{+}泪滴状的肌上皮样细胞位于外侧。与之相反，$Muc^{+}/CD10^{-}/ESA^{+}$细胞生成泡样、$K18^{+}$的导管细胞，$Muc^{-}/CD10^{+}/ESA^{-}$细胞生成肌上皮样细胞。在含有胶原，不含有 EGF 的三维培养体系中，$Muc^{+}/CD10^{-}/ESA^{+}$细胞生成$K18^{+}/K19^{+}$的球体，而$Muc^{-}/CD10^{-}/ESA^{+}$细胞生成的球体，外侧是$K14^{+}/\alpha$-SMA^{-}细胞，内侧是Muc^{+}细胞［Stingl et al.，1998］。在含有 EGF 的三维培养体系中$Muc^{-}/CD10^{-}/ESA^{+}$细胞生成末端导管小叶单位（TDLU）样结构［Stingl et al.，2001］。这些数据表明$Muc^{-}/CD10^{+}/ESA^{+}$细胞具有等级结构，其中含有干细胞，可以生成乳腺中其他的上皮细胞。

肌上皮和导管上皮在细胞活动旺盛的乳腺组织中保持稳定状态，涉及的机制除了前面实验中提示的谱系等级制外，还有另外一个，即通过未分化的中间细胞介导谱系间的转变［Wagers and Weissman，2004］。在培养体系中，肌上皮样和导管上皮样细胞均可以形成克隆，提示通过简单的自我复制来补充细胞的可能性。在含有高浓度霍乱毒素的二维培养体系中［Kao et al.，1995；Pechoux et al.，1999］，研究人员证明，导管上皮系细胞可以通过未分化的中间细胞介导转化成肌上皮系细胞。可以采用磁珠从乳房缩小整形术组织中分离表达 Muc 的细胞或表达 CD10 的细胞，然后将它们在肌上皮特异性（CDM4）或导管上皮特异性（CDM6）培养基中培养（见 12.3.2 节和 12.3.3 节中培养基组成）［Pechoux et al.，1999］。使用二维胶电泳，研究人员发现在 CDM4 或 CDM6 培养基中生长的表达 CD10 的细胞，具有肌上皮的特性，而在 CDM6 培养基中生长的表达 Muc 的细胞主要是导管上皮细胞，若将它们转移到 CDM4 培养基中，这些细胞会获得肌上皮的特性。在原位，推定的具有转化能力的中间细胞表型是 $vimentin^{+}$，α-SMA^{-}，$K19^{+}$，这些细胞位于基底膜的上方或腺腔的位置。与这些数据同时出现的研究，采用的是培养的人乳腺上皮细胞，但这些细胞的纯化方法不同。但这些研究没有排除成体干细胞向谱系分化的可能性，同时，它们本身可能会为培养基具有选择性这一论点作依据。在体内是分级分化还是相互转变起作用，目前我们还无从得知。所以，令人惊讶的是在另外一个有两个谱系细胞的器官—胰腺中，终末分化的β细胞是通过自我复制产生的。虽然有很多报道指出在实验条件下，终末分化的β细胞与外分泌导管细胞有直接联系［Dor et al.，2004］。乳腺发育期和怀孕过程中，乳腺内细胞的活动差别很大，因此，分级分化和相互转变可能在乳腺中均起作用，我们可能需要 3D 培养模式来模拟生理条件，从而更好的研究乳腺。不管是通过哪种机制，在原代培养中，乳腺干细胞生长有限，所以科研人员发明了其他方法来研究乳腺干细胞的潜能。

Band 实验室的工作［Wazer et al.，1995］发现虽然多个基因改变可以导致恶性转化，但表达人乳头瘤蛋白 E6 和 E7 只能引起细胞永生化。因此，我们通过转染人乳头瘤蛋白 E6 和 E7，使细胞永生，克服了细胞衰老的问题，从而可以对Muc^{-}/ESA^{+}人乳腺干细胞进行深入研究［综述见 Dimri et al.，2005］。在转染人乳头瘤蛋白 E6 和 E7 之前，原代细胞在 CDM3 培养基中培养［见 12.3.4 节］，该培养基可以支持肌上皮和腔上皮原代细胞的增殖。Muc^{-}/ESA^{+}细胞被命名为 D920，在不含有霍乱毒素的 H14

培养基中培养，可以生成 Muc^- / ESA^+ 和 Muc^+ / ESA^+ 细胞。D920 细胞系是从正常的乳腺组织中分离得到，体外培养时，它不具有转化表型，在裸鼠体内也不引起肿瘤。D920 不仅可以表达 K19，该分子被认为是乳腺干细胞的标志物，其克隆还可以在 2D 培养体系中生成表达 K14 和 K19 的细胞，在 lrECM 中生成具有明显小管的双层膜状 TDLU 样结构（如图 12.4；见方案 12.2 lrECM 中 3D 培养）。这些细胞在裸鼠体内，可以定植到去除上皮的脂肪垫中，证明在 Muc^- / ESA^+ 细胞中含有干细胞 [Gudjonsson et al.，2002]。这些数据支持乳腺发育的等级分化模式，但同时也表明 3DlrECM 培养体系可以作为一个合适的替代微环境，用于研究人乳腺干细胞。

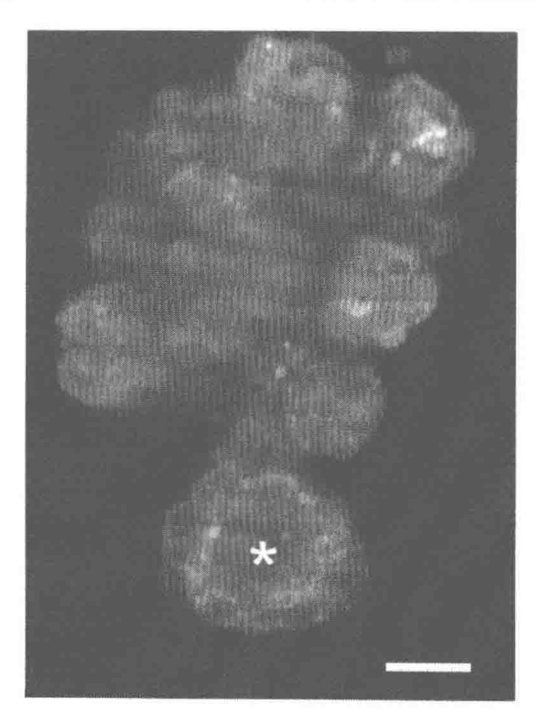


图 12.4 在 3D lrECM 培养体系中生长的 Muc^- / ESA^+/$CD29^{hi}$ 的 D920 细胞形成 TDLU 样结构。共聚焦显微镜下，该结构表达 K14（红色）和 K8（绿色）。为体现三维效果，显示的映象是对多个光学断层的重建。星号表示一个腺腔。比例尺＝50μm（也可见彩图 15）

12.4.2.2 乳腺球的生成

原代神经干细胞在体外培养中可以形成神经球，采用类似的方法，发现非永生化的乳腺干细胞可以形成乳腺球。使用不含血清和霍乱毒素的培养基和贴壁性弱的培养皿，可以得到这种乳腺球结构 [Reynolds and Weiss，1996]。从乳房缩小整形术组织标本中获得的原代细胞形成的乳腺球，可以在胶原包被的表面生长，且在 2D 培养体系中，可以生成导管上皮，肌上皮以及混合表型的克隆。在 3DlrECM，混合克隆可以生成 TDLU 样结构和双层（具有腔膜和肌上皮层）的腺泡。腺泡可以产生 β-酪蛋白、乳汁蛋白，提示人乳腺细胞的功能性分化。从初级乳腺球中分离的细胞可以形成次级乳腺

球，次级乳腺球同样具有在 3DlrECM 培养体系中形成 TDLU 样结构的能力，呈现出自我更新和干细胞的一些特性。乳腺球的组成细胞是异质的，表明形成乳腺球的细胞为干细胞创造了合适的微环境。

方案 12.2 是对 D920 细胞系形成 TUDL 的检测。这种基本的 3D 检测方案可以应用于大部分乳腺细胞［Petersen et al.，1992］。

方案 12.2　lrECM 三维培养乳腺干细胞

试剂和材料

无菌

☐ D920 细胞或等同物
☐ H14 培养基（见 12.3.4 节）
☐ DMEM/0.5FB/EDTA：DMEM，含有 0.5%FBS 和 0.1mmol EDTA
☐ 不含血清的 DMEM
☐ Matrigel
☐ 抗鼠 igG 磁珠
☐ MACS 柱

非无菌

☐ 含冰的冰盒

步骤

(a) 在Ⅰ型胶原包被的培养瓶中用 H14 培养基培养 D920 细胞至 70%～80%汇合。
(b) 消化细胞，用 DMEM/0.5FB/EDTA 重悬至 1×10^7 个细胞/ml。
(c) 加入 1∶50 稀释的抗 ESA 抗体，置冰上孵育 30min。
(d) 用 10ml 无血清的 DMEM 洗涤一遍，然后用 DMEM/0.5FB/EDTA 重悬至 1×10^7 个细胞/ml。
(e) 按照制造商推荐的浓度，加入抗鼠 IgG 磁珠，置冰上孵育 30min。
(f) 用 10ml 无血清的 DMEM 洗涤一遍，然后用 DMEM/0.5FB/EDTA 重悬至 1×10^7 个细胞/ml。
(g) 将细胞悬液加入到合适体积的 MACS 柱中。
(h) 用 3 倍细胞悬液体积的 DMEN/0.5FB/EDTA 培养基洗涤 MACS 柱。
(i) 从磁铁上取下柱子，用 H14 培养基洗脱。
(j) 将基底膜基质（Matrigel）置于冰上，在 24 孔板中每孔加入 50μl 包被。
(k) 置 37℃，10min 使之聚合。
(l) 与此同时，用 300μl 冰浴的 Matrigel 重悬 1×10^3～1×10^4 的 D920 细胞。
(m) 加入到包被的 24 孔板中，置 37℃，10min 使之聚合。
(n) 加入 H14 培养基，每 2 天换液。

尤其对干细胞，从单克隆中生出组织结构是必要的，但这一过程并不是总能够发生，有时，需要找出合适的环境。一些成功的方法包括使用小容量的培养皿，如 384 孔板，条件性培养基和成纤维细胞饲养层 [Amit et al.，2004]。

识别人乳腺干细胞需要特定的培养方法，这些方法是从多个领域汇集而成的，实验结果是证明人乳腺是等级发育的产物，并可通过使用多种培养和植入模式重建乳腺。乳腺中可以发生相互转变，这一点在 2D 培养体系中也得到了证明，但证据没有分级分化充分。人乳腺干细胞的生物化学特性可能是 Muc^-/ ESA^+/$CD10^+$/$K19^+$/$K14^+$/α-SMA^-/$vimentin^+$。人乳腺中不含有端芽，并且在怀孕之前，腺泡也不多，基于这些观察，研究人员认为，干细胞最可能的存在部位是小管。至本文完成之际，还没有确凿的证据表明 CD29、CD24 和 CD49f 是人干细胞的标志物，但它们是小鼠干细胞的标志分子。

12.5　结果矛盾还是数据不同

将多种 2D 和 3D 培养模式联合起来，可以作为研究人干细胞群体的有力工具，但在解释数据时，总有一些因素需要谨慎考虑。将人细胞培养的结果与转基因和敲除实验的结果或与未培养的原代人细胞作比较，可以发现有一些完全不同的数据。虽然很令人费解，但从表面上理解，这些不同的数据提供的信息还是很重要的，以下会讨论其中一些数据。

12.5.1　侧群细胞

侧群（side population，SP）最初是在造血组织中发现的，它作为一个亚细胞群体，可以有效排出 Hoechst33342 染料，并且排出染料物时对异搏定很敏感 [Goodell et al.，1996]。从骨髓中分离的 SP 细胞，具有很强的造血干细胞活性，在缺乏替代标志物的情况下，该方法被用于从其他成体组织中分离具有干细胞活性的细胞。因此，可从小鼠乳腺上皮细胞中分离 SP 细胞，该种细胞表达 Sca-1，在体外培养 3 天后，可以定植到去除上皮的脂肪垫中 [Welm et al.，2002]。与之相反，另外两个实验室证明从新鲜的，未培养的小鼠乳腺上皮细胞中分离得到的 SP，其中不含具有乳腺干细胞活性的细胞 [Shackleton et al.，2006；Stingl et al.，2006]。在人细胞中，形成乳腺球的能力被认为是干细胞群体的特性，从组织中分离的 SP 细胞若未经过体外培养的干预，具有很强的乳腺球形成能力 [Dontu et al.，2003]。小鼠实验得到的不同结果可以用小鼠品系不同或染色方法不同来解释，而小鼠和人未培养细胞之间的差异则与种系相关。为明确这一点，对照实验需要使用相似的技术同时进行。然而，这些观察结果可能提示乳腺中 SP 不富含最原始的干细胞，但却与短期多能前体细胞直接相关，这些前体细胞可能相当于短期造血重建干细胞。如果是这样，那么培养条件是促进早期短暂增殖前体细胞的生长，而不是原始干细胞。所以，在培养的乳腺上皮或原代组织中分离的 SP，可能会富含多能前体细胞，这些细胞可作为乳腺球培养。

12.5.2 组织的三维培养基质

已知，基因表达可以随微环境中的决定因子而改变［有关以乳腺为中心的文献综述见 Bissell et al.，2005］。因此，我们毫不惊奇不同的 3D 微环境会从推定的乳腺干细胞中诱导出不同的效果。很多研究人员均发现由层粘连蛋白-1 和Ⅰ型胶原或基底膜基质（Matrigel）组成的 3DlrECM 可以为人和小鼠乳腺上皮细胞的分化创造合适的环境［Barcellos-Hoff et al.，1989；Petersen et al.，1992］这一概念已扩展到从人和小鼠中分离的原代以及永生的乳腺干细胞。在这一微环境下，细胞具有形成复杂的 TDLU 样结构的能力，这些结构含有导管细胞和肌上皮细胞组成的双膜并且可以产生乳汁。在胶原胶中，用与上述相似的方法，研究人员分离出推定的人乳腺干细胞，这些细胞可以形成支状结构，其中含有 $K14^+$ 肌上皮细胞组成的外层和散在的 $K18^+$ $K19^+$ 导管细胞组成的内层，但这些作者没有报道有小管或表达 α- SMA 的细胞［Stingl et al.，2001］。先前，我们已经证明在Ⅰ型胶原上培养的腔上皮细胞具有相反的极性，而这一相反极性在加入 Laminin-1（不是 Lamminin-5 或 10/11）或肌上皮细胞后会得到纠正［Gudjonsson et al.，2002a］。综上，这些实验突出了富含 Laminin 的 3D 培养和胶原胶培养之间的显著差异。因此对 lrECM 的信号反应不单单是生长抑制，还包括纠正组织极性。这些结果表明在胶原胶上，乳腺干细胞不能完全分化为 TDLU 样结构，而 lrECM 更为接近乳腺的微环境。值得注意的是 ECM 和细胞之间的相互作用可能是组织特异性的，因为至少 MDCK 细胞在Ⅰ型胶原上产生极性［O'Brien et al.，2001］。

12.5.3 干细胞中的信号传导

干细胞中信号传导的大部分知识都是基于对其他细胞类型的研究，如成纤维细胞和对转基因，以及基因敲除动物的回顾性研究。上述的最新进展促进了检测乳腺干细胞中信号转导调控的能力。通过使用乳腺球和 cDNA 芯片分析，研究人员发现 Notch 信号通路在乳腺干细胞中发挥重要作用。Notch 信号通路活化可以增加次级乳腺球的数目，同时促进干细胞向肌上皮方向分化［Dontu et al.，2003］。与此相反，若用抗体阻断 Notch-4 受体或用抑制剂阻断所有的 Notch 信号通路，会减少次级乳腺球的形成。由此得出结论，Notch 信号通路活化可促进乳腺球形成细胞的自我更新和向肌上皮细胞分化［Buono et al.，2006］。但是，在 RBP-Jκ 基因敲除的小鼠模型中得到的结果与上述结论不符。RBP-Jκ 基因是哺乳动物体内四种 Notch 受体的关键中间信号分子，敲除该基因的小鼠，未发育的乳腺是正常的，但在孕期，分化的乳腺中缺乏导管细胞。由此，研究人员认为导管细胞的维持需要 Notch 信号通路活化。上述两个研究结果之间的差别可以用人和小鼠细胞存在差别或体内与体外培养存在差别来解释。但也可以有另外的解释，乳腺微环境主要是由层粘连蛋白组成和乳腺球可以在胶原上培养。上述研究加上 3D 培养微环境中所得到的结果，研究人员认为层粘连蛋白-1 最有可能作为必要的共同作用因子，在乳腺细胞中参与整合各种分化信号，（见 Weaver et al.［2002］了解正确的组织极性对乳腺功能的重要性）。

12.6 结论

在人体中进行基因工程试验既不可能，也不符合伦理，因此发展人乳腺细胞培养技术对定位，分离和鉴定人乳腺干细胞非常关键和必要。显然，需要通过改进模型，来更精确的反映微环境，这样现有和即将发明的培养技术就可以用于解决一系列新问题：

干细胞如何整合调控其功能和行为的信号？

微环境（其他细胞，激素，生长因子，ECM 分子-简言之龛位）在正常的乳腺形态形成以及肿瘤发生和发展中起什么作用？

干细胞如何与肿瘤相关？

不同类型乳腺癌的细胞病因学是什么？

研究人员注意到肿瘤在组织学上的亚型具有谱系限制性，提示干细胞和祖细胞可能参与肿瘤的形成。已有两种不同的白血病的发病进程反映了这一概念：慢性髓系白血病来源于造血干细胞，急性髓系白血病来源于定向粒细胞—巨噬细胞前体细胞［Daley，2004；Jamieson et al.，2004］。从乳腺肿瘤中分离出的干细胞样细胞，可以连续移植到裸鼠体内形成肿瘤，但是这些细胞是否与正常的乳腺干细胞或祖细胞直接相关还不清楚［Al-Hajj et al.，2003］。有人提出假说：干细胞微环境可能在肿瘤发生和发展过程中起重要作用［见综述 Bissell and Labarge，2005］。因为研究人员已发现啮齿类动物和人的乳腺干细胞和祖细胞具有分级分化，并且识别出这些细胞各自在乳腺中的位置，目前应对它们的转化表型以及微环境对特定生物学行为的作用做深入研究。对科研人员的一个严峻挑战是找出确凿的证据证明一个正常的干细胞可以生成乳腺，而且将这个干细胞转化后可以在体内生成肿瘤。TDLU 从单个细胞形成是很复杂的，但 3D 培养微环境可以模拟其形成和功能，所以可将 3D 培养微环境作为一个可延展的平台来证明这种关系。

12.7 材料来源

试剂	供货公司
抗鼠 IgG 磁珠	Miltenyi Biotech
抗坏血酸	Sigma
B27 补充物	Invitrogen（GIBCO）
牛血清白蛋白	Sigma
霍乱毒素	Sigma
胶原酶	Sigma
培养瓶 25cm^2	Nunc
联丁酰基 CAMP	Sigma
DMEM	Invitrogen（GIBCO）
表皮生长因子（EGF）	BD Biosciences
17β-雌二醇	Koch-Light Ltd.，Suffolk，UK
ESA（UV-1D9）	NovoCastra
乙醇胺	Merck

续表

试剂	供货公司
胎球蛋白	Sigma
bFGF（FGF-2）	Sigma
纤维连接蛋白	Sigma
谷氨酸盐	Sigma
Ham's F-12	Invitrogen（GIBCO）
肝磷脂	Sigma
重组人肝细胞生长因子	Sigma
HEPES 缓冲液	Invitrogen（GIBCO）
马血清	Atlanta Biologicals
氢化可的松	BD Biosciences
胰岛素	Sigma
MACS 柱	Miltenyi Biotech
乳腺上皮生长培养基，MEGM	Cambrex（previously BioWhittaker）
Matrigel	BD Biosciences
磷酸乙醇胺	Sigma
泌乳素	Sigma
亚硒酸钠	BD Biosciences
微量元素混合物，GIBCO	Invitrogen
转铁蛋白	Sigma
三碘甲状腺氨酸	Sigma
Vitrogen-100	Cohesion Technologies

（王世华　译）

参考文献

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez A, Morrison S.J., Clarke M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:3983–8.

Amit, M., Shariki, C., Margulets V, Itskovitz-Eldor J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* **70**:837–45.

Barcellos-Hoff, M. H., Aggeler, J., Ram T.G., Bissell M.J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* **105**:223–35.

Bennett, D. C., Peachey, L.A., Durbin, H., Rudland, P.S. (1978). A possible mammary stem cell line. *Cell* **15**:283–98.

Bissell, M. J. (1981). The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a normal cell in culture. *Int. Rev. Cytol.* **70**:27–100.

Bissell, M. J., P. Kenny, A., Radisky DC. (2005). Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **70**:1–14.

Bissell, M. J. and Labarge, M. A. (2005). Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* **7**:17–23.

Buono, K. D., Robinson, G. W., Martin C, Shi S, Stanley P, Tanigaki K, Honjo T, Hennighausen L. (2006). The canonical Notch/RBP-J signaling pathway controls the balance of cell lineages in mammary epithelium during pregnancy. *Dev. Biol.* **293**:565–80.

Chang, C. C. (2006). Recent translational research: stem cells as the roots of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **8**:103.

Daley, G. Q. (2004). Chronic myeloid leukemia: proving ground for cancer stem cells. *Cell* **119**:314–6.

Dawson, P. J., Wolman, S. R., Tait L, Heppner G.H., Miller F.R. (1996). MCF10AT: a model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. *Am. J. Pathol.* **148**:313–9.

Deome, K. B., Faulkin, L. J. Jr., Bern, H.A., Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* **19**:515–20.

Deugnier, M. A., Faraldo, M. M., Teuliere J, Thiery JP, Medina D, Glukhova MA. (2006). Isolation of mouse mammary epithelial progenitor cells with basal characteristics from the Comma-Dbeta cell line. *Dev. Biol.* **293**:414–25.

Dimri, G., Band, H., Band, V. (2005). Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res.* **7**:171–9.

Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **17(10)**:1253–70.

Dontu, G., Jackson, K.W., McNicholas, E, Kawamura, M.J., Abdallah, W.M., Wicha M.S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* **6**:R605–15.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429(6987)**:41–6.

Fuchs, E., Tumbar, T., Guasch G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**:769–78.

Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., Mulligan, R.C.. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J *Exp. Med.* **183**:1797–806.

Gudjonsson, T., Ronnov-Jessen, L., Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW. (2002a). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J. Cell Sci.* **115(Pt 1)**:39–50.

Gudjonsson, T., Villadsen, R., Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. (2002b). Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev.* **16**:693–706.

Howard, B. A. and Gusterson, B. A. (2000). Human breast development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **5**:119–37.

Jamieson, C. H., Weissman, I. L., Passegue E. (2004). Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell* **6**:531–3.

Joseph, N. M. and Morrison, S. J. (2005). Toward an understanding of the physiological function of mammalian stem cells. *Dev. Cell* **9**:173–83.

Kao, C. Y., Nomata, K., Oakley C.S., Welsch, C.W., Chang, C.C. (1995). Two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammoplasty: phenotypic characterization and response to SV40 transfection. *Carcinogenesis* **16**:531–8.

Kenney, N. J., Smith, G. H., Lawrence E, Barrett JC, Salomon DS. (2001). Identification of stem cell units in the terminal end bud and duct of the mouse mammary gland. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**:133–143.

Kordon, E. C. and Smith, G. H., (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* **125**:1921–30.

Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:4966–71.

Medina, D. and C. Daniel (1996). Experimental models of development, function, and neoplasia. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1**:3–4.

Medina, D., Oborn, C. J., Kittrell, F.S., Ullrich, R.L. (1986). Properties of mouse mammary epithelial cell lines characterized by in vivo transplantation and in vitro immunocytochemical methods. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**:1143–56.

O'Brien, L. E., Jou, T. S., Pollack, A.L., Zhang, Q., Hansen, S.H., Yurchenco, P., Mostov, K.E. (2001). Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat. Cell Biol.* **3**:831–8.

Pechoux, C., Gudjonsson, T., Ronnov-Jessen, L,, Bissell, M.J., Petersen, O.W. (1999). Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev. Biol.* **206**:88–99.

Petersen O.W., van Deurs B, Nielsen KV, Madsen MW, Laursen I, Balslev I, Briand P. (1990). Differential tumorigenicity of two autologous human breast carcinoma cell lines, HMT-3909S1 and HMT-3909S8, established in serum-free medium. *Cancer Res.* **50**:1257–70.

Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A.R., Bissell, M.J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9064–8.

Petersen, O. W. and van Deurs, B. (1988). Growth factor control of myoepithelial-cell differentiation in cultures of human mammary gland. *Differentiation* **39**:197–215.

Potten, C. S., Watson, R. J., Williams, G.T., Tickle. S., Roberts. S.A., Harris. M., Howell, A. (1988). The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br. J. Cancer* **58**:163–170.

Ratsch, S. B., Gao, Q., Srinivasan S, Wazer DE, Band V. (2001). Multiple genetic changes are required for efficient immortalization of different subtypes of normal human mammary epithelial cells. *Radiat. Res.* **155(1 Pt 2)**:143–150.

Reynolds, B. A. and Weiss S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* **175**:1–13.

Russo, J. and Russo, I. H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* **49**:2–15.

Shackleton, M., F. Vaillant, Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439(7072)**:84–8.

Shen, K. C., Miller, F., Tait, L., Santner, S.J., Pauley, R., Raz, A.A., Tainsky, M., Brooks, S.C., Wang, Y.A. (2006). Isolation and characterization of a breast progenitor epithelial cell line with robust DNA damage responses. *Breast Cancer Res. Treat.* **98**:357–64.

Shetty, A., Loddo, M, Fanshawe, T., Prevost, A.T., Sainsbury, R., Williams, G.H., Stoeber, K. (2005). DNA replication licensing and cell cycle kinetics of normal and neoplastic breast. *Br. J. Cancer* **93**:1295–300.

Smith, G. H. and G. Chepko (2001). Mammary epithelial stem cells. *Microsc. Res. Tech.* **52**:190–203.

Soule, H. D., Maloney, TM, Wolman, S.R., Peterson, W.D. Jr, Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J, Pauley, R.J., Jones, R.F., Brooks, S.C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50(18)**:6075–86.

Soule, H. D. and McGrath C. M., (1986). A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. In vitro *Cell Dev. Biol.* 22:6–12.

Spangrude, G. J., Heimfeld, S, Weissman I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241(4861)**:58–62.

Stampfer, M., Hallowes, R.C., Hackett, A.J. (1980). Growth of normal human mammary cells in culture. In vitro **16**:415–25.

Stampfer, M. R. (1982). Cholera toxin stimulation of human mammary epithelial cells in culture. In vitro **18**:531–7.

Stingl, J., Eaves, C.J., Kuusk U., Emerman, J.T. (1998). Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation* **63**:201–13.

Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., Emerman, J.T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **67**:93–109.

Stingl, J., Eirew, P, Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**:993–7.

Taylor-Papadimitriou, J. and Lane, E.B. (1987). Keratin expression in the mammary gland. In: *The Mammary Gland*. M. C. Neville and C. W. Daniel, Plenum Publishing Corporation, pp. 181–215.

Taylor-Papadimitriou, J., Lane, E.B., et al. (1983). Cell lineages and interactions in neoplastic expression in the human breast. In: *Understanding Breast Cancer, Clinical and Laboratory Concepts*. P. Furmanski. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc,: pp. 215–246.

Taylor-Papadimitriou, J., Stampfer, M., Bartek, J., Lewis, A., Boshell, M., Lane, E.B., Leigh, I.M. (1989). Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J. Cell Sci.* **94**:403–13.

Till, J. E., McCulloch, E.A., Siminovitch, L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**:29–36.

Villadsen, R. (2005). In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution. *Apmis* **113**:903–21.

Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Gudjonsson, T., Rank, F., Rønnov-Jessen, L., LaBarge, M.A., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human mammary gland. *Journal of Cell Biology* (In Press).

Wagers, A. J. and I. L. Weissman (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**:639–48.

Wazer, D. E., Liu, X.L., Chu, Q., Gao, Q., Band, V. (1995). Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3687–91.

Weaver, V.M., Lelievre, S., Lakins, J.N., Chrenek, M.A., Jones, J.C., Giancotti, F., Werb, Z., Bissell, M.J. (2002). β_4-Integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* **2**:205–16.

Welm, B. E., Tepera, S.B., Venezia, T., Graubert, T.A., Rosen, J.M., Goodell, M.A. (2002). Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev. Biol.* **245**:42–56.

第 13 章　脂肪来源干细胞的组织培养

KRISTINE M. SAFFORD and HENRY E. RICE

Departments of Surgery, Duke University Medical Center and Duke University School of Medicine, Durham NC 27710, USA. Correspondence to Henry E. Rice, MD, Department of Surgery, Box 3815, Duke University Medical Center, Durham, NC27710. Corresponding Author: rice007@mc. duke. edu

13.1　背景知识

13.1.1　引言

干细胞和祖细胞群体存在于多种成体组织中，包括皮肤、肌肉、骨髓和脂肪［Adachi et al.，2002；Nnodim，1987；Caplan，1994；Prockop，1997；Nicoll et al.，2001；Weissman et al.，2001；Young et al.，2001］。越来越多的研究表明这些细胞可能具有多系分化的潜能，能够生成除来源组织以外的细胞类型。近年来，人们发现成体脂肪组织可作为间充质干细胞另外一个丰富的来源［Gimble et al.，1992；Halvorsen et al.，2000，2001a；Zuk et al.，2001；Erickson et al.，2002；Safford et al.，2002；Awad et al.，2003］。这些细胞被命名为脂肪来源的干细胞（ASCs）。在特定的培养条

件下，ASCs 可诱导分化为多种间充质和神经类型细胞。

13.1.2　目的

脂肪组织作为成体干细胞的来源，其含量丰富又易获得［Gimble and Guilak，2003］。1964 年，Rodbell 最初从啮齿类动物脂肪组织中分离出一种祖细胞群体［Rodbell，1964］。后来几年，这种分离细胞的步骤经过改进，应用于从人脂肪组织中分离祖细胞［Hauner et al.，1989；Moore et al.，1995；Lalikos et al.，1997］。2001 年，Halvorsen 改进了现有的分离方法，使用抽脂作为原材料，证明了这种丰富且能再生的组织可以作为未来临床治疗的细胞来源，具有很大的潜力［Halvorsen，et al.，2001a；Zuk et al.，2001］。

13.1.3　选择 ASCs 用于分化的基本原理

目前，从脂肪中分离 ASCs 的方法，各个研究人员之间存在一些差别，但基本上都是先用胶原酶消化，再通过离心从脂肪细胞中分离出基质血管细胞。差异离心可将基质血管细胞沉淀与悬浮的成熟脂肪细胞分离。沉淀中除 ASCs，还包括血细胞，成纤维细胞和内皮细胞［Gimble and Guilak，2003；Hauner et al.，1989；Deslex et al.，1987］。基质血管细胞沉淀可以接种到塑料培养瓶中。基质细胞可贴壁，造血和其他杂质细胞不贴壁，在随后的传代过程中被除去。最终得到的 ASCs 可在很长时间内保持未分化状态。

ASCs 具有成纤维细胞样形态，胞内缺乏脂肪细胞中所见的脂滴。体外扩增后，ASCs 的表型会发生改变，主要体现在细胞表面蛋白和细胞因子表达的变化［Gronthos et al.，2001］。ASCs 的这种表型与骨髓和骨骼肌来源的干细胞相似［Zuk et al.，2001，2002；Gronthos et al.，2001；Williams et al.，1994；Young et al.，1999］。脂肪组织是干细胞一个非常丰富的来源，干细胞在其中的比例介于 1∶100 到 1∶1500 之间，远超过 MSC 在骨髓中所占的比例［De Ugarte et al.，3003；Kral and Crandall，1999］。

13.2　培养基和试剂的准备

13.2.1　培养基

13.2.1.1　脂肪来源干细胞的培养基（ASC 培养基）

ASC 培养基是含有 10％胎牛血清的 DMEM。添加 1％青霉素 100U/ml，链霉素 100μg/ml。

13.2.1.2　神经诱导培养基

(i) DMEM ………………………………………… 1×
(ii) EtOH 溶的丁基羟基苯乙醚 ………………… 36μg/ml（0.2mol/L）
(iii) 氯化钾 ………………………………………… 5mmol/L

(iv) 水溶的丙戊酸 ························ 2mmol/L
(v) DMSO 溶的毛喉萜(forskolin) ························ 10μmol/L
(vi) EtOH 溶的氢化可的松 ························ 1μmol/L
(vii) 水溶的胰岛素 ························ 5μg/ml
(viii) 青霉素 ························ 100U/ml
(ix) 链霉素 ························ 100μg/ml

13.2.1.3 成脂诱导培养基

(i) DMEM/F12 ························ 1×
(ii) 胎牛血清 ························ 3%
(iii) 生物素 ························ 33μmol/L
(iv) 泛酸盐 ························ 17μmol/L
(v) 牛胰岛素 ························ 1μmol/L
(vi) 地塞米松 ························ 1μmol/L
(vii) 异丁基甲基黄嘌呤 ························ 0.5mmol/L
(viii) 罗格列酮 ························ 1μmol/L
(ix) 青霉素/链霉素 ························ 100U/ml 100μg/ml

13.2.1.4 脂肪细胞维持培养基

除异丁甲基黄嘌呤和罗格列酮外，其他成分与成脂诱导培养基相似（见 13.2.1.3 节）。

(i) DMEM/F12 ························ 1×
(ii) 胎牛血清 ························ 3%
(iii) 生物素 ························ 33μmol/L
(iv) 泛酸盐 ························ 17μmol/L
(v) 牛胰岛素 ························ 1μmol/L
(vi) 地塞米松 ························ 1μmol/L
(vii) 青霉素/链霉素 ························ 100U/ml 100μg/ml

13.2.1.5 成骨诱导培养基

(i) DMEM（高糖） ························ 1×
(ii) 胎牛血清 ························ 10%
(iii) β-甘油磷酸 ························ 10mmol/L
(iv) 抗坏血酸-2-磷酸盐 ························ 0.2mmol/L (5 μg/ml)
(v) 1，25 二羟基维生素 D_3 ························ 10nmol/L
(vi) 地塞米松 ························ 10nmol/L
(vii) 青霉素/链霉素 ························ 100U/ml 100μg/ml

13.2.1.6　成软骨诱导培养基

(i) DMEM（低糖）………………………………………………………………… 1×
(ii) 丙酮酸钠 ……………………………………………………………… 110mg/L
(iii) ITS+ ……………………………………………………………………… 1%
(iv) 抗坏血酸-2-磷酸盐 ……………………………………………… 0.15mmol/L
(v) TGF-β1 ………………………………………………………………… 10ng/ml
(vi) 地塞米松 …………………………………………………………… 100nmol/L
(vii) 青霉素/链霉素 …………………………………………… 100U/ml 100μg/ml

13.2.2　胰蛋白酶

将储存浓度的胰蛋白酶（0.25%）与不含钙镁离子的 Dulbecco's 磷酸缓冲盐按照 1∶10稀释，终浓度为 0.025%。

13.2.3　Ⅱ型胶原酶

100ml Hank's 缓冲盐溶液中加入 1g 牛血清白蛋白和 0.1gⅡ型胶原酶。

13.3　取材和细胞分离

人和小鼠的脂肪组织均可用于分离 ASC，可以获得相当数目的 ASCs。人脂肪组织通常来源于抽脂。小鼠脂肪组织则取自腹股沟处脂肪垫。

13.3.1　从小鼠腹股沟脂肪垫获取 ASCs

方案 13.1　小鼠脂肪组织取材

试剂和材料

无菌

☐ Hank's 缓冲盐溶液（HBSS）
☐ ASC 培养基（见 13.2.1 节）
☐ 胶原酶溶液（见 13.2.3 节）
☐ 聚乙烯吡咯酮碘溶液
☐ 陪替氏培养皿，9cm
☐ 离心管，50ml
☐ 组织培养瓶，25cm^2
☐ 剪刀（2 把）
☐ 镊子（2 把）
☐ PBSA

非无菌

☐ 小鼠，4～6 只

☐ 麻醉剂：三溴乙醇

☐ 37℃ 水浴

步骤

(a) 37℃ 水浴中预热 HBSS 和 ASC 培养基。

(b) 麻醉动物后处死。

(c) 转移动物至层流净化罩中。

(d) 70%酒精消毒腹部。

(e) 采用低位横向切口打开腹腔。

(f) 用镊子取出性腺/附睾和腹股沟处的脂肪垫。

(g) 将脂肪置于培养皿中，加入 HBSS。

(h) 待所有动物脂肪取出后，将脂肪转移至新的培养皿中。

(i) 加入含有 5%聚乙烯吡咯烷碘酮的 HBSS 2～3min。

(j) 漂洗组织并用 HBSS 洗涤脂肪。

(k) 用无菌镊子将脂肪转移至 50ml 离心管中。

(l) 用无菌剪刀将脂肪切碎。

(m) 加入与组织体积相同的胶原酶溶液并混匀。

(n) 将离心管置于 37℃水浴中 60min，其间不时混匀一下。

(o) 离心，50～100g，5min。

(p) 取出离心管，用力摇晃（将基质细胞与原代脂肪细胞完全分离），再次离心 5min。

(q) 小心吸去上层油脂，油脂层中含有原代脂肪细胞，注意不要破坏位于下方的基质—血管细胞层。

(r) 加入 5～10ml PBSA，重悬沉淀，再次离心 5min。

(s) 洗涤三次，注意不要吸走基质—血管细胞层。

(t) 最后一次洗涤后，加入 8ml ASC 培养基重悬沉淀，转移至 T25 培养瓶中，置于 37℃，5%CO_2温箱中。

(u) 待细胞贴壁生长 2～4 天后换液。

(v) 换液时通过弃去培养基，从而去除未贴壁的细胞。

(w) 以后每周更换培养基 2 次。

13.4 脂肪干细胞培养和扩增

13.4.1 ASC 培养

分离获得 ASC 后，可以通过连续传代使其生长和扩增。原代培养后，传代 2～3 次，ASCs 呈现单层，大而扁的细胞形态，其直径在 25～30μm（图 13.1）。待细胞达到

汇合时，它们形态上呈纺锤体形，类似于成纤维细胞。

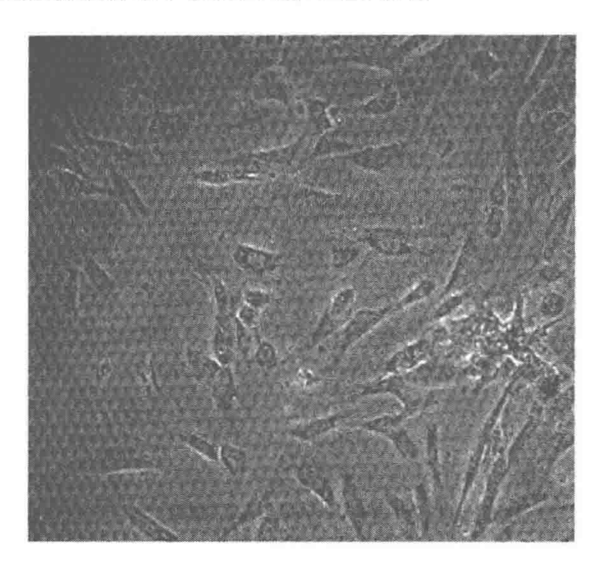


图 13.1　在条件培养基中生长的 ASCs 呈现单层，大而扁的细胞形态。放大倍数 200×

方案 13.2　脂肪干细胞的原代培养

试剂和材料

- □ ASC 培养基（见 13.2.1.1 节）
- □ 组织培养瓶，$25cm^2$

步骤

(a) 待细胞贴壁生长 2～4 天后换液。
(b) 换液时通过弃去培养基，从而去除未贴壁的细胞。
(c) 以后每周更换培养基 2 次。

13.4.2　ASC 扩增

ASC 可以通过连续传代使其扩增。从脂肪组织中分离的基质细胞，在原代培养时，常混有少量的造血细胞，内皮细胞和平滑肌细胞［Zuk et al.，2001］。通过连续传代，这些细胞的比例迅速降低，特别是表达造血或上皮标志物的细胞，在传代 2～3 次后即消失［Safford et al.，2002；Gronthos et al.，2001］。

方案 13.3 脂肪干细胞的传代培养

试剂和材料

☐ ASC 培养基
☐ PBSA
☐ 组织培养瓶，25cm² (T-25)
☐ 胰蛋白酶（见 13.2.2 节）
☐ 细胞刮

步骤

(a) 细胞达到 80%汇合时即可传代。
(b) 弃去培养基，加入 PBSA 洗涤贴壁细胞。
(c) 加入足量胰蛋白酶，使之覆盖细胞，将培养瓶中，置于 37℃，5%CO_2温箱中。
(d) 细胞与胰蛋白酶共孵育 3min 后，用细胞刮将细胞刮下。
(e) 加入 ASC 培养基使胰蛋白酶失活。
(f) 按照 1∶2 比例，将细胞接种至 2 个 T-25 培养瓶中。

13.5 ASCs 的特征及分化

在培养过程中，ASCs 可在很长时间内保持未分化状态。ASCs 具有成纤维细胞样形态，胞内缺乏脂肪细胞中所见的脂滴。体外扩增后，ASCs 的表型会发生改变，主要体现在细胞表面蛋白和细胞因子表达的变化 [Gronthos et al., 2001]。ASCs 的表型与骨髓和骨骼肌来源的干细胞相似 [Zuk et al., 2001; Gronthos et al., 2001; Williams et al., 1994b; Young et al., 1999]。

13.5.1 脂肪干细胞向神经分化

最近的研究发现，ASCs 同骨髓来源的基质细胞相似，均可向神经样细胞分化 [Safford et al., 2002, 2004; Zuk et al., 2001; Kang et al., 2003]。诱导 ASCs 向神经分化有几种不同的方法，但通常均需要将多种诱导试剂混合使用。Safford 等 [2002] 和 Zuk 等 [2001, 2002] 使用的诱导培养基相似，均含有叔丁对甲氢砜，丙戊酸和毛喉萜。Kang 等在最近的研究中，采用了不同的诱导体系 [Kang et al., 2003]。他们首先将氮胞苷加入到 ASCs 培养基中，这是一种去甲基化试剂，可以影响基因表达。然后用含有 B27 维生素的神经诱导基础培养基促进 ASCs 的神经分化 [Brewer et al., 1993]（见 13.6 节）。在另外一项研究中，Ashjian 等采用吲哚美平、异丁基甲基黄嘌呤和胰岛素诱导 ASCs 向神经分化 [Ashjian et al., 2003]。13.4 节中的方案是 Safford 等 [2002] 和 Zuk 等 [2001] 使所采用的。

在神经诱导培养基中培养数个小时后，很多 ASCs 形态会发生变化，胞浆向胞核方

向聚集，胞体收缩，部分胞浆外展。大部分 ASCs 细胞逐渐成球形，有折射力，并形成核周体，提示诱导细胞已具有原始神经/胶质细胞表型。这些形态上的变化最早可在诱导培养 5h 就出现［Safford et al.，2002］。

免疫组化染色发现，诱导的 ASCs 可以表达神经细胞标志物，包括 NeuN、MAP2、tau、β-Ⅲ微管蛋白和 NSE，可表达的神经胶质细胞标志物，包括胶质纤维酸性蛋白（GFAP）、波形蛋白（vimentin）和 S100。但体外神经诱导的 ASCs 不表达少突胶质细胞的标志物 04 。表达神经表型标志物的 ASCs 所占的比例相对较高，如表达 NeuN 的 ASCs 占诱导细胞的 80%。这种现象表明在这个异质细胞群体中，大部分细胞都或多或少有一定程度的神经分化。此外，一些细胞共表达 NeuN 和 GFAP，提示至少在短期培养体系中，部分 ASCs 具有向神经细胞和神经胶质细胞分化的潜能。

方案 13.4　脂肪干细胞的神经分化

试剂和材料

□ 神经诱导培养基（见 13.2.2.2 节）
□ PBSA

步骤

（a）吸去培养基。
（b）加入 PBSA 润洗细胞。
（c）加入神经诱导培养基，将培养瓶放回温箱。

13.5.2　ASCs 的脂肪分化

ASCs 可被诱导表达脂肪标志物，这一技术最初是由 Halvorsen 等建立［Halvorsen et al.，2001a；Guilak et al.，2006］。ASCs 在成脂诱导培养基中培养三天，然后将诱导培养基更换成脂肪细胞生长培养基［Guilak et al.，2006］。在此诱导体系下，ASCs 中出现核周脂滴，并表达特异性的分化标志物，包括 aP2、PPAR2 和 C/EBP［Erickson et al.，2001；Halvorsen et al.，2001a，b］。

方案 13.5　脂肪干细胞的脂肪分化

试剂和材料

□ 脂肪诱导培养基（见 13.2.1.3 节）
□ 脂肪细胞生长培养基（见 13.2.1.4 节）
□ PBSA

步骤

(a) 吸去培养基。
(b) 加入 PBSA 润洗细胞。
(c) 加入脂肪诱导培养基，将培养瓶放回温箱。
(d) 三天后，将诱导培养基更换成脂肪细胞生长培养。

13.5.3　ASCs 的骨分化

ASCs 可被诱导表达成骨细胞标志物，这一技术最初是由 Halvorsen 等建立，提示 ASCs 在组织工程应用中的潜能 [Halvorsen et al.，2000；Halvorsen et al.，2001a；Guilak et al.，2006]。

方案 13.6　脂肪干细胞的骨分化

试剂和材料

☐ 成骨诱导培养基（见 13.2.1.5 节）
☐ PBSA

步骤

(a) 吸去培养基。
(b) 加入 PBSA 润洗细胞。
(c) 加入成骨诱导培养基，将培养瓶放回温箱。

13.5.4　ASCs 的软骨分化

ASCs 可在体外诱导分化成具有软骨细胞表型的细胞。在成软骨诱导培养基中，培养一段时间后，ASCs 可表达谱系特异性的蛋白，转录因子和基因 [Zuk et al.，2003；Gimble and Guilak，2003；Gimble，2003]。

方案 13.7　脂肪干细胞的软骨分化

试剂和材料

☐ 成软骨诱导培养基（见 13.2.1.6 节）
☐ PBSA

步骤

(a) 吸去培养基。

（b）加入 PBSA 润洗细胞。

（c）加入成软骨诱导培养基，将培养瓶放回温箱。

13.6　材料来源

试　剂	供货公司
抗坏血酸-2-磷酸盐	Sigma
B27 补充物	Invitrogen
生物素	Sigma
牛胰岛素	Sigma
丁基羟基苯乙醚	Sigma
Ⅰ型胶原酶	Sigma
地塞米松	Sigma
DMEM/F12	Invitrogen
胎牛血清	Invitrogen
forskolin	Sigma
β-甘油磷酸	Sigma
Hanks 缓冲盐溶液（HBSS）	Invitrogen（GIBCO）
氢化可的松	Sigma
胰岛素	Invitrogen
异丁甲基黄嘌呤	Sigma
ITS＋	Sigma
氯化钾	Sigma
泛酸盐	Sigma
青霉素/链霉素	Invitrogen
磷酸缓冲盐溶液（PBSA）	Invitrogen
罗格列酮	GlaxoSmithKline
丙酮酸钠	Sigma
转化生长因子-β1	Invitrogen（GIBCO）
胰蛋白酶	Invitrogen
丙戊酸	Sigma
1，25 二羟基维生素 D_3	Sigma

（王世华　译）

参 考 文 献

Adachi, N., Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J. (2002). Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J. Rheumatol.* **29(9)**:1920–1930.

Ashjian, P.H., Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. (2003). In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* **111(6)**:1922–31.

Awad, H., Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F. (2003). Effects of transforming growth factor

beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* **9(6)**:1301–1312.

Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* **35(5)**:567–76.

Caplan, A., 1994. The mesengenic process. *Clin. Plast. Surg.* **21(3)**:429–435.

De Ugarte, D.A., Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **174**:101–119.

Deslex, S., Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. (1987). Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int. J. Obes.* **11(1)**:19–27.

Erickson, G., Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290(2)**:763–769.

Gimble, J. and F. Guilak. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* **5(5)**:362–369.

Gimble, J., Youkhana K, Hua X, Bass H, Medina K, Sullivan M, Greenberger J, Wang CS. (1992). Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J. Cell Biochem.* **50(1)**:73–82.

Gimble, J.M. (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* **3(5)**:705–713.

Gronthos, S., Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiol.* **189(1)**:54–63.

Guilak, F., Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell Physiol.* **206(1)**:229–237.

Halvorsen, Y., Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM. (2001a). Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* **7(6)**:729–741.

Halvorsen, Y., W. Wilkison, and J. Gimble. (2000). Adipose-derived stromal cells—their utility and potential in bone formation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24, Suppl 4**:S41–S44.

Halvorsen, Y.D., Bond A, Sen A, Franklin DM, Lea-Currie YR, Sujkowski D, Ellis PN, Wilkison WO, Gimble JM. (2001b). Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism* **50**:407–413.

Hauner, H., G, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J. Clin. Invest.* **84(5)**:1663–1670.

Holiday, R. (1996). DNA methylation in eukaryotes: 20 years on. In *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, A.D. Riggs, Editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 692.

Kang, SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. (2003). Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* **183**:355–366.

Kral, J. and D. Crandall. (1999). Development of a human adipocyte synthetic polymer scaffold. *Plast. Reconstr. Surg.* **104**:1732–1738.

Lalikos, JF, Li YQ, Roth TP, Doyle JW, Matory WE, Lawrence WT. (1997). Biochemical assess-

ment of cellular damage after adipocyte harvest. *J. Surg. Res.* **70(1)**:95–100.

Moore, JH Jr, Kolaczynski JW, Morales LM, Considine RV, Pietrzkowski Z, Noto PF, Caro JF., et al. (1995). Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plast. Surg.* **19(4)**:335–339.

Nicoll, S., Wedrychowska A, Smith NR, Bhatnagar RS. (2001). Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass culture and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype. *Connect. Tissue Res.* **42(1)**:59–69.

Nnodim, J. (1987). Development of adipose tissues. *Anat. Rec.* **219(4)**:331–337.

Prockop, D. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276(5309)**:71–74.

Rodbell, M. (1964). Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **239**:753–755.

Safford, KM., Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. (2004). Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.* **187(2)**:319–328.

Safford, K., Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294(2)**:371–379.

Weissman, I., D. Anderson, and F. Gage. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**:387–403.

Williams, S., D. Rose, and B. Jarrell. (1994b). Microvascular endothelial cell sodding of ePTFE vascular grafts: improved patency and stability of the cellular lining. *J. Biomed. Mater. Res.* **28(2)**:203–212.

Williams, S.K., D.G. Rose, and B.E. Jarrell. (1994a). Liposuction derived human fat used for vascular sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type. *J. Vasc. Surg.* **19**:916–923.

Young, HE., Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* **264**:51–62.

Young, H.E., Steele TA, Bray RA, Detmer K, Blake LW, Lucas PW, Black AC Jr. (1999). Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC Class I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **221**:63–71.

Zuk, P., Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**:4279–4295.

Zuk, P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7(2)**:211–228.

缩 略 语

2D	two-dimensional	二维的
3D	three- dimensional	三维的
α-MEM	α-modified minimal essential medium	α-改良的极限必需培养基
α-SMA	α-smooth muscle actin	α-平滑肌肌动蛋白
ABCG2	ATP-binding cassette transporter G family member	ATP 结合盒转运蛋白 G 家族成员
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	活化的白细胞黏附分子
AP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
ASC	adipose-derived stem cell	脂肪衍生的干细胞
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt	5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸 p-甲苯胺盐
bFGF	basic fibroblast growth factor(FGF-2)	碱性成纤维细胞生长因子
BHA	butylated hydroxyanisole	叔丁对甲氧酚
BM	bone marrow	骨髓
BM-MSC	bone marrow mesenchymal stem cell	骨髓间充质干细胞
BMP	bone morphogenetic protein	骨形态形成蛋白
BrdU	bromodeoxyuridine	溴脱氧尿苷
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BSC	biological safety cabinet	生物学安全橱
BSP	bone sialoprotein	骨涎蛋白
CAFC	cobblestone area-forming cell	卵圆石区形成细胞
CBE	cord blood-derived embryonic-like stem cell	脐带血衍生的胚胎样干细胞
Cbfa1	core binding factor 1	核心结合因子 1
CB-MPC	cord blood multipotent progenitor cell	脐带血多能祖细胞
CB-MSC	cord blood mesenchymal stem cell	脐带血间充质干细胞
CDM	chondrocyte differentiation medium	软骨细胞分化培养基
CFU	colony-forming unit	集落形成单位
CFU-BL	colony-forming unit-blast	集落形成单位-母细胞
CFU-F	colony-forming unit-fibroblast	集落形成单位-成纤维细胞
cGy	centiGray	厘格雷
CMF-Saline G	calcium-and magnesium-free Hank's Saline G	无钙镁 Hank's 盐水 G
CNPase	2′,3′-cyclic nucleotide-3′-phosphodiesterase	2′,3′-环核苷酸-3′-磷酸二酯酶
CECM	corneal endothelial cell medium	角膜内皮细胞培养基
COMP	cartilage oligomatrix protein	软骨寡基质蛋白
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole	4′,6-双脒-2-苯吲哚
dH_2O	deionized water	去离子水
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium	Dulbecco 改良的 Eagle 培养基

DMEM/F-12	Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12,1∶1	Dulbecco改良的Eagle培养基/营养混合物F12,1∶1
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline complete with Ca^{2+} and Mg^{2+}	含Ca^{2+}和Mg^{2+}的Dulbecco完全磷酸缓冲液
DPSC	dental pulp stem cell	牙髓干细胞
DSPP	dentin sialophosphoprotein	牙质涎磷蛋白
EB	embryoid body	胚胎样小体
EBM	Eagle's basal medium	Eagle基础培养基
EC	embryonal carcinoma	胚胎癌
ECC	embryonic carcinoma cell	胚胎癌细胞
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EGC	embryonic germ cell	胚胎生殖细胞
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EnC	endothelial cell	内皮细胞
ES	embryonic stem (cell)	胚胎干(细胞)
ESA	epithelial-specific antigen	上皮特异性抗原
ESC	embryonic stem cell	胚胎干细胞
ESM	endothelial spheres medium	内皮细胞球体培养基
EtOH	ethanol	乙醇
FACS	fluorescence-activated cell sorting	荧光激活细胞分选
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FGF	fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
GAD	glutamic acid decarboxylase	谷氨酸脱羧酶
GASP	gentamicin, amphotericin B, streptomycin, penicillin	庆大霉素,二性霉素B,链霉素,青霉素
gcEB	germ cell embryoid body-like structures	生殖细胞胚胎小体样结构
GCT	grem cell tumor	生殖细胞瘤
GFAP	glial fibrillary acidic protein	胶质纤维酸性蛋白
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
GvHD	graft-versus-host disease	移植物抗宿主疾病
HA/TCP	hydroxyapatite/tricalcium phosphate	羟基磷灰石/三钙磷酸盐
HAM	human amniotic membrane	人羊膜
HBSS	Hank's balanced salt solution	Hank's平衡盐溶液
HCEC	human corneal endothelial cell	人角膜内皮细胞
hECC	human embryonal carcinoma cell	人胚胎癌细胞
hEGC	human embryonal germ cell	人胚胎生殖细胞
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	4-(2-羟乙基)-哌嗪-1-乙磺酸
hES	human embryonal stem (cell)	人胚胎干(细胞)
hESC	human embryonal stem cell	人胚胎干细胞

HFEA	Human Fertilisation and Embryology Authority	人体受精和胚胎学管理局
HG-DMEM	high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium	高葡萄糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基
HLA	human leukocyte antigen	人白细胞抗原
HPP-CFC	high proliferative potential colony-forming cell	高增殖潜能集落形成细胞
HSC	hematopoietic stem cell	造血干细胞
HUCPV	human umbilical cord perivascular	人脐带血管周的
ICAM	intercellular adhesion molecule	细胞间黏附因子
ICC	immunocytochemistry	免疫细胞化学
ICM	inner cell mass	内细胞团
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium	Iscove 改良的 Dulbecco 培养基
ITS	Insulin，trnsferrin，and selenium	胰岛素、转铁蛋白和硒
IVF	*in vitro* fertilization	体外受精
LG-DMEM	low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium	低葡萄糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基
LMP agarose	low-melting point agarose	低熔点琼脂糖
LPL	lipoprotein lipase	脂蛋白脂酶
IrECM	laminin-rich extracellular matrices	富含层粘连蛋白的细胞外基质
LOH	loss of heterozygosity	杂合子丢失
LSC	limbal stem cell	肢干细胞
LTC-IC	long-term culture-initiating cell	长期培养启始性细胞
mEF	mouse embryo fibroblast	小鼠胚胎成纤维细胞
MEF	mouse embryo feeder (cells)	小鼠胚胎饲养层(细胞)
mEGC	mouse embryonic germ cell	小鼠胚胎生殖细胞
mESC	mouse embryonic stem cell	小鼠胚胎干细胞
MGS	multipotent germline stem cell	多潜能生殖系干细胞
MLPC™	Multi-Lineage Progenitor Cell™	多谱系祖细胞™
MNC	mononuclear cell	单核细胞
MSC	mesenchymal stem cell	间充质干细胞
Muc	sialomucin	唾液酸黏蛋白
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride	氯化硝基四氮唑蓝
N-CAM	neural cell adhesion molecules	神经细胞黏附分子
NeuN	neuronal nuclear marker	神经细胞核标志
NFP	neurofilament protein	神经丝蛋白
NOD/SCID	nonobese diabetic/severe combined immunodeficient	非肥胖性糖尿病/重度联合免疫缺陷
NS	neural stem cell	神经干细胞
OKT9	anti-transferrin receptor monoclonal antibody	抗转铁蛋白受体的单克隆抗体
OSC	osteocalcin	骨钙蛋白
P	passage(as in subculture)	传代(传代培养)
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PBSA	Dulbecco's phosphate-buffered saline，solution A(no Ca^{2+} or Mg^{2+})	Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液，溶液 A(无 Ca^{2+} 或 Mg^{2+})

PBSC	Dulbecco's phosphate-buffered saline with 1mmol/L $CaCl_2$ and 1mmol/L $MgCl_2$	含1mmol/L $CaCl_2$ 和1mmol/L$MgCl_2$ 的Dulbecco磷酸缓冲盐溶液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PFA	paraformaldehyde	多聚甲醛
PGC	primordial germ cell	原始生殖细胞
PGD	preimplantation genetic diagnosis	植入前遗传学诊断
PI	propidium iodide	碘化丙啶
PPARγ2	peroxisome proliferator-activated receptor-γ2	过氧化物酶体增殖子活化受体-γ2
PA	retinoic acid	维甲酸
RS	rapidly self-renewing(cell)	快速自我更新(细胞)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	反转录多聚酶链反应
Runx	Runt-related transcription factor	Runt相关的转录因子
Sca-1	stem cell antigen-1	干细胞抗原-1
SHED	stem cells from human exfoliated deciduous teeth	来自脱落的乳牙的干细胞
SIM	Sandoz Inbred Mice	Sandoz近交系小鼠
SNP	single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
SR	slowly replicating (cell)	慢复制性(细胞)
SSEA	stage-specific early antigen	阶段特异性早期抗原
STR	short tandem repeat	短串联重复序列
TA	transit amplifying	过渡扩增
TDLU	terminal ductal lobular unit	终端导管小叶单位
TEMED	*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylethylenediamine	*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基乙二胺
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
TH	tyrosine hydroxylase	酪氨酸羟化酶
TMRM	tetramethylrhodamine methyl ester	四甲基罗丹明甲酯
TPOFLK	thrombopoietin, Flt-3 ligand, and c-kit ligand	血小板生成素、Flt-3配体、c-kit配体
UC	umbilical cord	脐带
UCB	umbilical cord blood	脐带血
USSC	unrestricted somatic stem cell	不受限的体干细胞
VNTR	variable number tandem repeat	可变数目的串联重复
WJ	Wharton jelly	Wharton胶
Wpc	weeks postconception	孕后数周
ZO-1	zonula occludens-1	闭锁小带-1

(李志琴 章静波 译)

索　引

（按汉语拼音排序）

(Q-2186. 31)

生命科学实验指南系列 · 典藏版



图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人干细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn
销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



本书彩插及
更多信息请扫码


ISBN 978-7-03-047486-5
9 787030 474865 >

定价（全套）：4500.00元

[General Information]
书名=人干细胞培养
作者=（英）R.I.弗雷谢尼，G.N.斯泰赛，（美）J.M.奥尔贝奇著；章静波，陈实平译
页数=293
SS号=14076111
DX号=
出版日期=2016.07
出版社=北京科学出版社